

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 1 月 22 日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/008132 A1

(51) 国際特許分類: G01N 27/447  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2002/007044  
(22) 国際出願日: 2002 年 7 月 11 日 (11.07.2002)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱電機株式会社 (MITSUBISHI DENKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒100-8310 東京都千代田区丸の内二丁目 2 番 3 号 Tokyo (JP).  
(72) 発明者: および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 稲富 健一

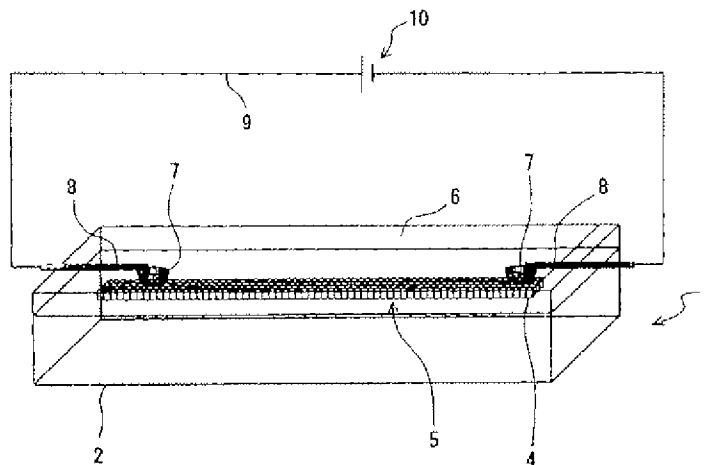
(INATOMI, Kenichi) [JP/JP]; 〒100-8310 東京都千代田区丸の内二丁目 2 番 3 号 三菱電機株式会社内 Tokyo (JP). 出尾 晋一 (IZUO, Shinichi) [JP/JP]; 〒100-8310 東京都千代田区丸の内二丁目 2 番 3 号 三菱電機株式会社内 Tokyo (JP). 大路 浩 (OHJI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒100-8310 東京都千代田区丸の内二丁目 2 番 3 号 三菱電機株式会社内 Tokyo (JP). 塩野 悟 (SHIONO, Satoru) [JP/JP]; 〒100-8310 東京都千代田区丸の内二丁目 2 番 3 号 三菱電機株式会社内 Tokyo (JP). 堤 和彦 (TSUTSUMI, Kazuhiko) [JP/JP]; 〒100-8310 東京都千代田区丸の内二丁目 2 番 3 号 三菱電機株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

/ 続葉有 /

(54) Title: BIO-MOLECULE SEPARATION CELL, MANUFACTURING METHOD THEREOF, AND DNA FRAGMENTATION APPARATUS

(54) 発明の名称: 生体分子分離セル及びその製造方法並びに DNA 分取装置



(57) Abstract: An electrophoresis cell has a substrate (2), and a groove (3) is formed on an upper surface of this substrate (2). The substrate (2) is formed of a transparent material enabling a user seeing through the substrate (2). The groove (3) includes a separation matrix (5) comprising a large number of stays (4). The upper surface of the substrate (2) and the groove (3) are covered by a transparent cover (6). In addition, the electrophoresis cell (1) has two sample inlets (7) and two electrodes (8). The electrode (8) are inserted into the groove (3) through corresponding sample inlets (7). Both of the electrodes (8) are connected to a DC power source (10) via a lead wire (9). This electrophoresis cell (1) can solve disadvantages in agarose gel and polyacrylic amide gel used in electrophoresis analysis, or in a conventional artificial separation matrix.

(57) 要約: 電気泳動セルは基板 2 を有し、この基板 2 の上面に溝 3 が形成されている。基板 2 は、該基板 2 内を透視することができるように透明な材料で形成されている。溝 3 は、多数の支柱 4 からなる分離マトリックス 5 を含んでいる。基板 2 の上面と溝 3 とは、透明なカバー 6 で覆われている。さらに、電

/ 続葉有 /

WO 2004/008132 A1



(81) 指定国 (国内): JP, US.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AE, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

電気泳動セル1には、2つの試料注入口7と、2つの電極8とが設けられている。各電極8は、それぞれ、対応する試料注入口7を通して溝3内に挿入されている。両電極8は、リード線9を介して直流電源10に接続されている。この電気泳動セル1によれば、電気泳動分析に用いられるアガロースゲルやポリアクリルアミドゲル、あるいは従来の人工的な分離マトリックスにおける欠点を克服することができる。

## 生体分子分離セル及びその製造方法並びにDNA分取装置

## 5 技術分野

本発明は、電気泳動セル等の生体分子分離セル及びその製造方法、並びに、該電気泳動セルを用いたDNA分取装置に関するものである。

## 背景技術

- 10 生体試料から抽出されたDNAや、蛋白質及びその断片などの生体分子は、医療検査や、医療診断や、生物検査に必須の要素である。これらの生体分子を生化学的に分析したり、その分子構造を調べることにより、病気の診断や、微生物の検出や、遺伝子の判定などが行われる。これらの生体分子は、分子量の大きい高分子であることが特徴である。これらの最も一般的な分析方法としては、電気泳動法が用いられる。電気泳動法では、生体分子は、分子の大きさ（分子量）や電荷の差異により、電圧が印加された分離マトリックスの中で分離される。電気泳動法としては、分離マトリックスにアガロースゲル（寒天ゲル）やポリアクリルアミドゲルを用いる手法が確立されている。この手法では、DNAや蛋白質が、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルの分子鎖の網目の中を通り抜けながら
- 15 分離される。これらのゲルの網目の穴は、5～200nmであろうと推定される。しかし、これらのゲルは、マイクロ構造が不均一であり、かつ形態が不安定である。このため、その取り扱いがむずかしく、次のような問題がある。

## （ゲルの問題点）

- 25 ①形態が不安定であるので、保存性が悪く、取扱い性が悪い。
- ②常に水分の包含が必要である。
- ③分離速度が小さい。
- ④ $\mu$ gレベルの比較的多量の試料が必要である。
- ⑤再利用することができない。
- ⑥高感度な光学検出を行うことができない。

⑦小型化が困難である。

これらの問題を解決するため、近年、半導体リソグラフィ技術を用いた電気泳動用のハードゲルが提案されている。具体的には、例えば、シリコン基板やガラス基板の上に、障害物として人工的なマイクロ構造物を形成し、これをゲルの網目の代替物として用いるようにしたものや、光学的に透明なプラスチックを微細加工成型して形成した人工分離マトリックスなどが提案されている。

前者の例としては、1992年に刊行されたネイチャー誌 (Nature)、第358巻、第600～602頁に掲載されているフォルクムス (Volkmuth) らによる報文や、2001年に刊行された分析化学誌 (Analytical Chemistry)、第73巻、第6053～6056頁に掲載されているバカジン (Bakajin) らによる報文に開示されたハードゲルがあげられる。これらの報文の中で、著者は、50～200キロベースペア (キロ塩基対) の長さを有するDNAの分析をターゲットとした、2酸化珪素やガラスからなる微細人工障害物を有する分離マトリックスを提案している。この分離マトリックスは、規則正しく配置された直径が数 $\mu\text{m}$ の支柱からなる。試料のDNAは、向きと角度とを交互に変えた電界を印加することにより、分離マトリックスの中で、その大きさに応じて分離され、試料の出口に設置された蛍光顕微鏡により観察ないし検出される。

他方、後者の例としては、ヤガー (Yager) らにかかる特表平11-508042公報に開示された、プラスチックを用いた人工分離マトリックスがあげられる。この人工分離マトリックスは、次の点で、シリコン基板やガラス基板をベースとする分離マトリックスと異なる。

(相違点)

①有機ポリマを分離マトリックス材料として用いる。

②人工的なマイクロ構造物の配列間距離は100nm以下であり、好ましくは10～30nmである。

③微細加工された鋳型中でポリマを重合させて分離マトリックスを製造する。

しかしながら、これらの従来技術には、次のような問題ないしは課題がある。すなわち、シリコンやガラスを電気泳動用の分離マトリックスに用いたものでは、次のような問題がある。

## (問題点)

①シリコンやガラスは加工性が悪く、高価で大量生産に向かない。

②支柱の直径や隙間は数 $\mu\text{m}$ 以上であるが、この値はアガロースゲルやポリ  
5 アクリルアミドゲルの網目に比べて100倍ほど大きく、小さなDNAの分析に  
は不適である。

他方、プラスチックを用いた人工分離マトリックスでは、次のような問題があ  
る。

## (問題点)

①分離マトリックスを製造する際の、ナノメートル(nm)～マイクロメータ  
10 ( $\mu\text{m}$ )のレベルでのプラスチック成型加工技術が未確立である。

②支柱の隙間間隔が100nm以下と狭く、水和したDNA分子が詰まりや  
すく、円滑な分離が困難である。

③微細加工した鋳型を用いる製造技術では、プラスチックの剥離工程や微細  
15 パターンの転写工程が、現時点では机上の論の域を出ず、実用化されていない。

## 発明の開示

本発明は、上記従来の問題を解決するためになされたものであって、例えば電  
気泳動分析に用いられるアガロースゲルやポリアクリルアミドゲル、あるいは従  
来の人工的な分離マトリックスにおける前記の欠点を克服することができる分離  
20 マトリックス、ないしは電気泳動セル等の生体分子分離セルと、その製造方法と  
を提供することを目的とする。さらには、かかる生体分子分離セルの応用技術を  
提供することも目的とする。

本発明にかかる生体分子分離セルは、例えば、電気泳動により、液体試料中の  
生体分子を分離又は検出する。生体分子分離セルは、表面に溝(流路)が形成さ  
25 れた基板と、分離マトリックスと、カバーと、溝内を満たす緩衝液と、少なくと  
も2つの電極とを備えている。分離マトリックスは、溝の一部の領域に配置され、  
支柱間の間隙の最も狭い部分が0.1～5 $\mu\text{m}$ である複数の支柱からなる。カバ  
ーは、基板の表面と溝とを覆い、かつ支柱の上面と密着する。電極は、緩衝液に  
直接接触し、この緩衝液に電圧を印加する。基板と分離マトリックスとは、高分

子材料で形成されている。

この生体分子分離セルでは、人工的なマイクロ障害物による分離マトリックスを、例えば電気泳動用のゲルの代替物として用いている。このため、分離マトリックスを小型化・軽量化することができ、乾燥状態で保存することができる。つまり、試料が少量であっても、DNA等の生体分子を、迅速かつ高感度で分離又は検出することができる。

この生体分子分離セルでは、分離すべき生体分子の大きさや性質に応じて、最適な構造を選択することができる。すなわち、設計の自由度が大きい。このため支柱の横断面は、例えば、円、長円、多角形、又は、角部を丸めもしくは切り取った多角形など、種々の形状とすることができる。

基板及び分離マトリックスの一部又は全部は、例えば、コストが安く量産が容易な高分子材料であるエラストマ、プラスチック等で形成されるのが好ましい。エラストマとしては、例えば、一般的な材料であり、かつ価格が安く成形性が良好なシリコーンゴムを用いるのが好ましい。また、プラスチックとしては、例えば、一般的な材料であり、かつ価格が安く成形性が良好なアクリル系樹脂、ポリスチレン系樹脂、ポリカーボネート系樹脂等を用いるのが好ましい。

溝の幅は20～1000ミクロンに設定され、溝の深さは1～50 $\mu$ mに設定され、また溝の長さは0.1～50mmに設定されるのが好ましい。このようにすれば、DNAなどの生体分子が、均一かつ円滑に電気泳動する。このため、高感度な検出が可能な電気泳動セルを実現することができる。

支柱の配置密度は、1000個/mm<sup>2</sup>以上であるのが好ましい。本発明では、例えば、DNAが支柱のサブミクロンオーダーの間隙を通りぬける際に、DNAの泳動速度に影響を与えるといったことを基本原理としているので、間隙の数が分離能に大きく影響する。そして、支柱の配置密度が1000個/mm<sup>2</sup>以上であれば、1000000塩基対以下のDNAの分離が可能である。

溝に生体分子試料を注入するための試料注入口がカバーに設けられている場合は、分離マトリックスが、試料注入口近傍に、その他の領域よりも支柱の配置密度が低い領域又は支柱が存在しない領域を有するのが好ましい。例えば、DNAは、支柱の上部の隙間から溝内には進入しにくい、このようにすれば、DNA

の注入が容易となる。

本発明にかかる上記生体分子分離セルの1つの製造方法では、まず、シリコン基板、ガラス基板又は高分子基板に微細加工を施して、溝及び支柱に対応するネガパターンを備えた鋳型を形成する。次に、この鋳型に、液状のエラストマもしくはプラスチック、又は、エラストマもしくはプラスチックの原料となるモノマもしくはプレポリマを流し込んで固化させる。この後、固化物を鋳型から分離して、基板と分離マトリックスとを備えた生体分子分離セルを得る。この製造方法によれば、鋳型の微細構造を忠実に転写することができ、電気泳動セルの量産が可能となる。

本発明にかかる上記生体分子分離セルのもう1つの製造方法では、まず、シリコン基板、ガラス基板又は高分子基板に微細加工を施して、溝及び支柱に対応するネガパターンを備えたプレス型を形成する。次に、ガラス転移温度以上に加熱したプラスチックをプレス型に押し付けた後、温度を低下させて硬化させる。この後、硬化物をプレス型から分離して、基板と分離マトリックスとを備えた生体分子分離セルを得る。この製造方法によれば、鋳型の微細構造を忠実かつ高速に転写することができるので、電気泳動セルの量産が可能となる。

本発明にかかるDNA分取装置は、電気泳動により液体試料中の生体分子を分離する本発明にかかる生体分子セルを利用して、溝内に供給されたDNAを含む液体試料から、該DNAの特性及び構造に基づいて、該DNAを分取（分離）又は分画する。このように、本発明にかかる電気泳動セルを、DNAの分析や医療検査に用いることにより、従来は操作性が悪く、分析に長時間を要していた遺伝子検査を、迅速に高感度で行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

本発明は、後記の詳細な説明及び添付の図面により、より十分に理解されるであろう。なお、添付の図面において、共通する構成要素には同一の参照番号が付されている。

図1は、高分子材料で形成された分離マトリックスを備えた、本発明にかかる電気泳動セルの全体的な斜視図（透視図）である。

図 2 は、図 1 に示す電気泳動セルないし分離マトリックスの一部を拡大して示す斜視図である。

図 3 は、図 1 に示す電気泳動セルの立面断面図である。

図 4 A～図 4 E は、種々の支柱の形状及び配置形態を示す立体的な模式図である。

図 5 A～図 5 E は、分離マトリックスの上面図であり、種々の支柱の配置形態を示している。

図 6 A～図 6 C は、それぞれ、試料注入口及び分離マトリックスの構造を示す 1 つの斜視図と 2 つの立面断面図とである。

図 7 A～図 7 G は、分離マトリックスを製作するための鋳型の作製方法と、この鋳型を用いた電気泳動セルの製作方法とを示す図である。

図 8 は、電気泳動セル用の蛍光顕微鏡及びその付属機器の構成ないしレイアウトを示す模式図である。

図 9 は、電気泳動セル内における DNA の塩基数と電気泳動速度との関係を示すグラフである。

図 10 は、支柱の間隙における DNA の動きを示す図である。

図 11 は、本発明にかかる電気泳動セルを用いた 1 つの DNA 分取装置の概略構成を示す模式図である。

図 12 A 及び図 12 B は、本発明にかかる電気泳動セルを用いたもう 1 つの DNA 分取装置の概略構成を示す模式図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、添付の図面を参照しつつ、本発明の実施の形態を具体的に説明する。ただし、各図において、共通する部材、すなわち構成及び機能が実質的に同一である部材には共通の参照番号を付し、重複する説明は、原則として省略する。

#### （電気泳動セルの概要）

まず、本発明にかかる電気泳動セルの概要を説明する。図 1 は、本発明にかかる電気泳動セルの基本形の全体構造を示している。図 2 はこの電気泳動セルの一部を拡大して示し、図 3 はこの電気泳動セルの立面断面を示している。



図1～図3に示すように、電気泳動セル1は基板2を有し、この基板2の上面に溝3が形成されている。基板2は、必ずしも透明である必要はないが、基板2内を透視することができるので、透明であるのが好ましい。溝3は、多数の支柱4（ピラー）からなる分離マトリックス5を含んでいる。基板2の上面と溝3とは、透明なカバー6で覆われている。さらに、電気泳動セル1には、2つの試料注入口7と、2つの電極8（正極及び負極）とが設けられている。各電極8は、それぞれ、対応する試料注入口7を通して溝3内に挿入されている。つまり、試料注入口7は、電極挿入穴を兼ねている。また、両電極8は、リード線9を介して直流電源10に接続されている。

電気泳動セル1において、分離マトリックス5を構成している各支柱4は、幾何学的な断面を有している。各支柱の上面は、カバー6の下面と密着している。そして、分離マトリックス5を含んでいる溝3には、電気泳動用の緩衝液が満たされ、したがって各支柱4の間隙には緩衝液が存在している。溝3内に挿入された各電極8は、溝3内の緩衝液に直接接触している。緩衝液中に生体分子が存在する場合、両電極8間に電圧が印加されると、該生体分子は帯電しているので、その帯電の態様に応じていずれか一方の電極8に向かって移動する。例えば、生体分子がDNA（デオキシリボ核酸）であれば、緩衝液の中で負に帯電しているので、溝3の延びる方向（両電極8を結ぶ方向）に沿って、正極である電極8（図1では、左側の電極）に向かって移動する。

基板2の形状や厚さはmとくには限定されず、用途や目的に応じて所望の形状とすることができる。ただし、成形が容易であり、かつ強度が高いので、基板2は板状であるのが好ましい。基板2の材料がエラストマである場合、該基板2の厚さは、カバー6との密着性を確保するため、3mm以上であるのが好ましい。分離マトリックス5を含む溝3は、基板2の表面に複数ないし多数設けられてもよい。DNA等の生体分子の流路となる溝3は、試料の注入や、他のDNA等の生体分子あるいは試薬との混合を容易にするため、交差していてもよい。また、溝3（流路）中に、円形や多角形などの形状の部分形成して、溝3の液体に対する抵抗や液体の移動速度を制御し、マイクロレベルでの流体的な調整を行ってもよい。

## (溝の構成)

以下、溝3の具体的な構成ないし機能を説明する。図1～図3に示す例では、溝3は、基板2の長手方向に延びる直線状の形状を有している。しかし、溝3の形状は、これに限定されるものではなく、例えばU字形、S字形又は円形であってもよい。ただし、この場合、溝3の湾曲部では、電界の分布が溝3に対して並行ではなくなるので、溝3の形状を工夫して電界補正や検出補正を行うことが必要である。

本発明にかかる電気泳動セル1は小型化が容易であるが、溝3の幅は $1\mu\text{m}$ 以上であるのが好ましく、 $20\mu\text{m}$ 以上であるのがより好ましい。溝3の幅が $1\mu\text{m}$ より狭い場合は、検出感度が低下し、生体分子の検出に高倍率の光学機器が必要となり、検出コストが高くなるからである。また、溝3の幅は $1000\mu\text{m}$ 以下であるのが好ましく、 $300\mu\text{m}$ 以下であるのがより好ましい。溝3の幅が $1000\mu\text{m}$ を超えると、電気泳動の均一性が損なわれるとともに、本発明の効果が小さくなるからである。しかし、本発明を、複数組の電極8を備えた2次元的な広がりを持つ分離マトリックス5、例えばパルスフィールド電気泳動の分離マトリックス5に適用する場合は、溝3の幅は $1000\mu\text{m}$ を超えてもよい。

溝3の深さは $1\mu\text{m}$ 以上であるのが好ましい。溝3の深さがこれより浅いと、本発明の効果が小さくなり、かつ検出感度が低下するからである。また、溝3の深さは $500\mu\text{m}$ 以下であるのが好ましく、 $50\mu\text{m}$ 以下であるのがより好ましい。溝3の深さが $500\mu\text{m}$ を超えると、DNA等の生体分子の上下方向の拡散が生じ、本発明の効果が小さくなるとともに、生体分子の検出時に光学的焦点を合わせにくくなり、検出感度が低下するおそれがあるからである。

溝3の長さ及び分離マトリックス5の長さは、任意に設定することができる。具体的には、例えば、分離すべき生体分子のターゲットや、各ターゲットに必要なとされる分離能に応じて、 $0.1\sim 50\text{mm}$ の範囲で決定することができる。しかし、これらの長さの上限は、後で説明する鋳型となるシリコンウエハの大きさにより制限されることがある。

## (電極の構成)

以下、電極8の具体的な構成ないし機能を説明する。この電気泳動セル1では、

電極 8 は、直径 0.2 mm の白金線であり、電源 10 のリード線 9 に半田付けにより接続されている。しかし、電極 8 は、末端が溝 3 内の緩衝液と接触することができれば、線状、板状、膜状（蒸着膜）のいずれの形状であってもよく、また大きさや厚さも、任意に設定することができる。電極 8 の材料は、500 V の電圧を印加することができ、数十 mA の電流を流すことができ、かつ電気分解や材料の溶出が起これなければ、どのようなものであってもよい。かかる材料としては、例えば、白金、金、カーボン、電導性高分子などがあげられる。

この電気泳動セル 1 では、白金線からなる電極 8 は、その大部分はカバー 6 の上面に配置され、その先端近傍部は、カバー 6 に設けられた試料注入口 7 を通して溝 3 内に挿入されている。しかし、電極 8 は、カバー 6 に直接接着又は蒸着されてもよい。また、外部の支持体から試料注入口 7 を通して、あるいは基板 2 の中を通して配線されてもよい。なお、電極 8 の先端近傍部を、試料注入口 7 を通すのではなく、カバー 6 に別途形成された電極挿入用穴を通して溝 3 内に挿入してもよい。

この電気泳動セル 1 では、電極 8 には、0.1 ~ 500 V/cm の範囲の直流電圧が印加される。しかし、パルス電圧が印加されてもよい。また、複数組の電極 8 が設けられている場合は、周期的に電流の方向が変わってもよい。

この電気泳動セル 1 において、溝 3 内の流路と、分離マトリックス 5 を構成する各支柱 4 の間隙とを満たしている電気泳動用の緩衝液としては、分離すべき生体分子が DNA の場合は、TBE 緩衝液（89 mM Tris-borate、2 mM EDTA）又は TAE 緩衝液（40 mM Tris-acetate、1 mM EDTA）が用いられる。緩衝液の pH は 8 前後である。また、分離すべき生体分子が蛋白質の場合は、該蛋白質の種類に応じて、その電気泳動に最適な緩衝液が用いられる。

#### （支柱の構成）

以下、支柱 4 の具体的な構成ないし機能を説明する。この電気泳動セル 1 では、図 2 から明らかなとおり、分離マトリックス 5 を構成している各支柱 4 の上面ないし横断面（支柱の中心軸線と垂直な面で切断した断面）の形状（以下、単に「断面形状」という。）は円形である。しかし、支柱 4 の断面形状は円形である必要はなく、任意の形状とすることができる。

例えば、図4A～図4Eに示すように、支柱4の断面形状は、角部を丸めた長方形（図4A）、楕円形（図4B）、正方形ないしひし形（図4C）、六角形（図4D）、長方形（図4E）であってもよい。あるいは、その他の多角形又は角部を切り落とした多角形であってもよい。さらに、DNA等の生体分子の流れがスムーズであれば、断面形状は、星形や、突起を有する幾何学形状であってもよく、また定まった形のないものであってもよい。各支柱4の断面形状はすべて同じである必要はなく、前記の各形状が混在していてもよい。例えば、支柱4の断面形状を、試料注入口7付近では楕円形とし、それ以外の部位では六角形としてもよい。

各支柱4の断面積は、支柱4の溝幅方向の寸法が溝3の幅より小さい限り、任意に設定することができる。ただし、DNA等の生体分子の上下方向の流れを均一にする必要がある場合は、支柱4の断面積は上下方向（支柱軸線方向）に均一であるのが好ましい。また、生体分子を溝3の深さ方向に分離させる場合、支柱4は、上下のいずれかに向かって細くなるテーパ状であってもよい。成形が可能であれば、支柱4は、立体的な幾何学形状のもの、例えば、複数の球体が連続して支柱を構成するといった形状のものであってもよい。

#### （支柱の配置）

以下、支柱4の具体的な配置形態を説明する。この電気泳動セル1では、図1及び図2から明らかなおおり、支柱4は、溝幅方向に互いに等間隔で離間する複数の支柱4が、溝長手方向に等間隔で並んだ配置形態で配列されている。しかし、支柱4の配置形態は、このようなものである必要はなく、任意のものとしてすることができる。分離マトリックス5としての機能を発揮させるため、支柱4は溝3の所定の領域に配置されるが、その配置形態ないし配列形態は、DNA等の生体分子がスムーズに流れる限り、規則性があっても、なくてもよい。しかし、支柱4の配置形態が規則性をもたない場合、均一な試料の流れを生じさせるには、支柱4をランダムに配置する必要がある。

図5A～図5Eに、溝3内における支柱4の配置形態（基板2の上面図）の5つの具体例を示す。図5Aに示す配置形態は、生体分子を平面視で2次元的に移動させることができる2次元配列パターンである。この配置形態では、長方形の

溝3の周りに、4つの試料注入口7と2組（4つ）の電極8とが配置されている。図5Bに示す配置形態は、溝3の長手方向に支柱4の配置密度ないし支柱4間の隙間が段階的に変化する配列パターンである。図5Cに示す配置形態は、溝3内に支柱4が1列に並んで配置された配列パターンである。図5Dに示す配置形態は、溝3内に支柱4が1列に並んで配置されるとともに、溝3の壁面が支柱として機能するように形成された配列パターンである。すなわち、分離マトリックス5は、独立した支柱4と溝3の壁面の一部である支柱4'とで構成されている。図4Eに示す配置形態は、溝3内に複数列の支柱4が配置された配列パターンであり、溝3の長手方向の一端に2つの試料注入口7が接続されている。

- 10 前述したとおり、パルスフィールド電気泳動の分離マトリックスに本発明を適用する場合は、例えば図5Aに示すような、複数の試料注入口7と複数組の電極8とを備えた2次元配列パターンの分離マトリックス5が必要である。溝3内への試料の注入を円滑化するために、試料注入口7に近いところでは、支柱4の配置密度を低くしてもよい（図5B参照）。また、DNA等の生体分子の濃縮領域を設けたり、生体分子を選択的に分離するためのゲートを設けてもよい。さらに
- 15 は、支柱4間の隙間に、1次元的又は2次元的な勾配をつけてもよい。

支柱4は、他の複数の支柱4に接触するように配置してもよく、あるいはその配列方向に連続して接触するように配置してもよい。なお、支柱4が溝3の側面に接触していてもよい。また、溝3の壁面を、支柱4に対応する形状でもって溝内に繰り返し突出させ、この突出部を支柱として利用してもよい。なお、最も単純な場合、分離マトリックス5は、溝3の一方の壁面の突出部のみ、又は両方の壁面の突出部のみで構成される。この場合、電気泳動セル1は、独立した支柱構造をもたない単純な流路デバイスとなる。

（試料注入口）

- 25 以下、試料注入口7の具体的な構成及び機能を説明する。生体分子を含む試料を溝3に注入するための試料注入口7は、1つだけ設けても、また複数ないし多数設けてもよい。試料注入口7を複数設けた場合、電気泳動セル1は、生体分子を分離する機能に加えて、複数の生体分子を混合する機能も発揮する（図5E参照）。

また、図 6 A に示すように、DNA 等の生体分子を含む試料を溝 3 内に注入しやすくするため、試料注入口 7 が配置された部位では、溝 3 内に支柱 4 を配置しない領域を設け、あるいは支柱 4 の配置密度を低くした領域を設けるのが好ましい。

図 6 B に示すように、試料注入口 7 が配置された部位に支柱 4 が他の部位と同様の配置密度で設けられている場合、試料は分離マトリックス 5 の上に導入された後、矢印 P 1 で示すように曲線的に流れて分離マトリックス 5 内に入る。この場合、試料の流れに対する抵抗が大きいので、試料を円滑に溝 3 内に注入することは困難である。

他方、図 6 C に示すように、試料注入口 7 が配置された部位に支柱 4 が設けられていない場合、試料は、支柱 4 が存在しない空間部に導入された後、矢印 P 2 で示すように直線的に流れて支柱 4 の側方から分離マトリックス 5 内に入る。この場合、試料の流れに対する抵抗が小さいので、試料を円滑に溝 3 内に注入することができる。

#### (生体分子の分離原理)

以下、電気泳動セル 1 における生体分子の分離原理を説明する。支柱 4 の間隔は、生体分子の分離にとって最も重要な要素である。なお、以下では、便宜上、支柱間の間隔の最も狭い部分を「支柱ギャップ」と呼び、支柱ギャップの大きさないし距離を「ギャップ距離」と呼ぶ。ギャップ距離は、分離されるべき生体分子が通り抜けるのに十分な大きさでなければならない。かつ、ギャップ距離は、生体分子の通過に対する障害物として機能し、さらに分子の大きさ、例えば分子の慣性半径で定義されるパラメータに依存して、生体分子の通過速度に影響を及ぼすことができるものでなければならない。本発明にかかる分離マトリックス 5 における DNA 等の生体分子の大きさ（分子量）に基づく分離原理は、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルにおけるそれと同様である。したがって、本発明にかかる電気泳動セル 1 は、電気泳動におけるゲルの網目の役割を、複数の支柱 4 からなる分離マトリックス 5 に代替させるものであるといえる。

一般に、緩衝液中の DNA は、ランダムコイル状態の線状ポリマであり、これらの変位長さは平均二乗末端間距離として表わすことができる。例えば、高分子溶液論で著名なポール J. フローリ (Paul J. Flory) によれば、DNA の変

位長さRは、次の式1で定義される。

$$R = 0.3 \times (\text{塩基数})^{1/2} [\text{nm}] \dots\dots\dots \text{式1}$$

式1によれば、DNAの大きさ（変位長さ又は慣性半径）は、塩基数の1/2乗に比例して増加する。電気泳動におけるアガロースゲルやポリアクリルアミドゲルの網目の役割は、通過するDNAに対して障害物となることである。したがって、DNAの大きさと分離マトリックス5のギャップ距離とが同程度のオーダーになれば、支柱ギャップを通過するDNAの分子鎖の運動がギャップ距離による影響を受け、支柱ギャップがエントロピー障壁の役割を果たすものと考えられる。すなわち、DNAが、その大きさよりも狭い支柱ギャップを通り抜けるときは、DNAが熱力学的にエントロピーが低い状態（変形した形）のコンフォメーションをとらざるを得ない。これが、DNAの分子量に依存して、DNAの電気泳動速度に差異が生じる原理である。

（支柱ギャップ）

以下、支柱ギャップないしギャップ距離についてさらに詳しく説明する。前記の原理から推察されるように、ギャップ距離がDNAの大きさと同程度であれば、DNAの移動に対して支柱ギャップが障害物となり、DNAの分子量に依存した分離を達成することができる。通常、電気泳動によるオリゴヌクレオチドの分離やDNAの10～1000塩基の配列決定に用いられる、アガロースやポリアクリルアミドのゲルの網目の大きさは10～100nmである（例えば、2000年に刊行された「蛋白質・核酸・酵素誌」、第45巻、第1号、第76～84頁に記載された馬場嘉信氏による報文参照）。したがって、1000塩基以下のDNA断片を分離する場合は、ギャップ距離は100nm以下であることが必須であるといえる（例えば、特表平11-508042号公報参照）。

他方、本発明にかかる分離マトリックス5では、最適なギャップ距離は0.1～5μmとされる。以下、この理由を説明する。表1は、塩基数が異なる3つのDNAについて、ギャップ距離とDNAの移動性との関連を調べた結果を示している。表1によれば、T4DNA（166kbp）及びλDNA（48.5kbp）は、ギャップ距離が0.1μm以下の場合、支柱ギャップを通過しにくいことがわかる。これは、DNAに水和した水分子の影響により、DNAの慣性半径

が、実際のDNAの大きさよりも大きくなっているためであると考えられる。

表1 ギャップ距離とDNAの移動性との関連性

ギャップ距離 [ $\mu\text{m}$ ]	T4DNA (166kbp)	$\lambda$ DNA (48.5kbp)	DNA (1kbp)
0.05	×	$\Delta$	$\Delta$
0.1	$\Delta$	$\Delta$	○
0.5	○	○	○
1.0	○	○	○
2.0	○	○	○
5.0	○	○	○
10.0	○	○	○
20.0	○	○	○

× : DNA通過不能

$\Delta$  : 一部通過

○ : 円滑に通過

5

すなわち、アガロースゲルなどの網目の物理的な大きさは10～100nmである。しかし、実際には、糖鎖分子やポリアクリルアミド分子鎖の影響、あるいはDNAに水和した水分子の影響が加わっている。アガロースやポリアクリルアミドの場合、これらの水分子は、DNAや、分離マトリックスである網目と相互作用を及ぼし合い、これによりDNAの分離が円滑に行われる。これらの分子鎖は弾力性があるため、DNAなどの水和水の効果を利用し、あるいは水分子の影響をうまく吸収しているものと推察される。これらの水和水の分子レベルでの大きさは、現時点では殆どわかっていないが、100nmレベルの隙間では、水和水の影響でDNAが浸入しにくいものと考えられる。逆浸透圧法や高圧液体クロマトグラフィなどにより、人工的に隙間に物理的な力（圧力など）を加えれば、水の透過は可能である。しかし、この場合、分離すべきDNA等の生体分子が破壊されるおそれがある。

15

20

他方、本発明にかかる分離マトリックス5では、ギャップ距離の上限値は5 $\mu\text{m}$ とされる。以下、この理由を説明する。表2は、T4DNAと $\lambda$ DNAとについて、ギャップ距離とDNAの移動速度との関連性を調べた結果を示している。表2によれば、ギャップ距離が5 $\mu\text{m}$ を超えると、移動速度差が確実には得られないことがわかる。そこで、ギャップ距離の上限値は5 $\mu\text{m}$ とされる。



表2 ギャップ距離とDNAの移動速度との関連性

ギャップ距離 [ $\mu\text{m}$ ]	T4 DNAと $\lambda$ DNAとについての電気泳動の移動速度差
0.5	○
1.0	○
2.0	○
5.0	○
10.0	△
20.0	×

×：速度差なし      △：条件によりあり      ○：速度差あり

(支柱の配置密度)

- 5      以下、支柱4の配置密度を説明する。分離マトリックス5における支柱4の配置密度は、基本的には任意に設定することができる。ただし、本発明にかかる分離マトリックス5は、DNAの通過速度が支柱ギャップによって影響されるといった原理に基づいているので、DNAの分離能は、DNAが通過する支柱ギャップの数に比例して向上する。本願発明者による実験によれば、50～100 V/cmの条件での50～200 kbp（キロ塩基対）のDNAの電気泳動による移動速度は、平均50  $\mu\text{m}$ /秒であった。そして、1秒間に通過する支柱4（直径15  $\mu\text{m}$ の円柱）は約3個であり、支柱ギャップの数は6個であった。このとき、1000塩基対あたり約0.1  $\mu\text{m}$ の移動距離の差（塩基対が短いほど速く移動する）が観察された。溝3中の分離マトリックス5の長さを5 mmとすれば、このDNAは約100秒で分離マトリックス5を通過し、5 mm先の検出ポイントで、1000塩基対あたり約10  $\mu\text{m}$ の移動距離の差をもたらすことになる。検出系の光学分解能を5  $\mu\text{m}$ とすれば、この移動距離の差は、十分検出可能である。

- 15      この場合、DNAは、その移動距離1 mmあたり60個の支柱4と約120個の支柱ギャップとを通過する。電界の向きと垂直な支柱ギャップにはDNAが泳動しないものと仮定すれば、支柱ギャップの数は支柱4の数のほぼ2倍となる。したがって、支柱4の配置密度は約4000個/ $\text{mm}^2$ となり、支柱ギャップの配置密度は約14000個/ $\text{mm}^2$ となる。このDNAよりも短いDNAは、より早く泳動するので、支柱4の配置密度又は支柱ギャップの配置密度は、それぞれ、4000個/ $\text{mm}^2$ 又は14000個/ $\text{mm}^2$ よりも高くなければならない。

表3に、上記実験を、T4DNAとλDNAを用いて、さらに種々の支柱4の配置密度で繰り返し行い、支柱4の配置密度とDNAの移動速度差との関連性を求めた結果を示す。表3によれば、分離マトリックス5の支柱4の配置密度は、10000個/mm<sup>2</sup>以上であることが必要であることがわかる。

5

表3 支柱の配置密度とDNAの移動速度差の関連性

支柱の配置密度 [個/mm <sup>2</sup> ]	T4DNAとλDNAについての 電気泳動の移動速度差
100	×
500	△
1000	○
5000	○
10000	○
100000	○

×：速度差なし      △：条件によりあり      ○：速度差あり

#### (基板及び分離マトリックスの材質)

10      以下、基板2及び分離マトリックス5の材料について説明する。基板2及び分離マトリックス5の材料は、安価でありかつ量産しやすい高分子材料であれば、とくには制約はない。ただし、これらの材料は、光学的な検出が容易であることから、透明であるのが望ましい。したがって、やわらかい材料としては例えばエラストマを用いることができ、硬い材料としては例えばプラスチックを用いること  
15      ができる。エラストマである最も一般的な透明素材としては、シリコンゴム、ブタジエンゴム、イソプレンゴム、フッ素系ゴム、スチレン系透明ゴムなどの透明合成ゴムと、これらのブレンドゴムとがあげられる。また、性能としては、次の条件を満たせばよい。

密度：～1g/ml

20      給水率：0.1%以下

全光線透過率：85%以上

成形収縮率：1%以下

曲げ弾性率：300Mpa以上

硬化手法はどのようなものでもよいが、成形性の観点から、化学開始剤や架橋

剤により硬化を開始させる手法、あるいは熱硬化や光などのエネルギー線で硬化させる手法が好ましい。

他方、プラスチック材料は、励起光や蛍光を透過させるものであるのが好ましい。このような材料としては、例えば、ポリスチレン系樹脂、ポリスルホン系樹脂、  
5 アクリル系樹脂、ポリカーボネート系樹脂、ポリオレフィン系樹脂、塩素含有ポリマ、ポリエーテル系樹脂、ポリエステル系樹脂などをあげることができる。これらの樹脂は、単独、共重合、ブレンド、プレポリマのいずれの形態でもよい。成形の点では熱可塑性樹脂が好ましいが、熱硬化性又はエネルギー線硬化性の架橋重合体でもよい。また、基板2と溝3と分離マトリックス5とは同時に同一材料  
10 で成形するのが望ましい。ただし、接着が十分であれば、別々の材料を張り合わせたり、はめ込んでもよい。この場合、基板2の材料としては、例えば、セラミックス、ガラス、シリコン、ポリマーアロイなどを用いることができる。

(カバーの材料)

以下、カバー6の材料について説明する。カバー6の材料は、励起光及び蛍光  
15 を十分に透過させることができ、カバー6の下面が基板2、溝3及び分離マトリックス5（支柱4）の上面と十分に密着して液漏れを生じさせず、かつDNA等の生体分子を吸着しないものであれば、とくには制約されない。例えば、ガラス、プラスチック、エラストマなどを用いることができる。カバー6の表面は親水性であるのが好ましいが、疎水性であってもよい。カバー6の厚さは、任意に設定  
20 することができる。ただし、高倍率の検出系の光学焦点を考慮すれば、カバー6の厚さは2 mm以下であるのが好ましい。

(材料の表面処理)

以下、基板2、分離マトリックス5及びカバー6の材料の表面処理について説明する。基板2の表面は、疎水性であり、水との接触角度が45度以上であるのが望ましい。他方、溝3の表面、分離マトリックス5（支柱4）の表面、及びカ  
25 ー6の溝3を覆う部分の表面は、緩衝液が接触するのが容易となり、かつ毛細管現象で緩衝液が支柱4の隙間を自発的に満たすのが容易となるよう、親水性であるのが好ましい。したがって、これらの表面に親水化処理を施すのが好ましい。親水化はどのような方法で行ってもよい。具体的には、例えば、プラズマ処理、

プラズマ重合、コロナ放電、コーティングポリマ等の親水性化学物質のコーティング、物理的な微細構造による親水化処理などを用いることができる。

コーティングポリマとしては、例えばポリヒドロキシメチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、セルロース系ポリマなどがあげられる。ここで、注意すべきことは、これらのコーティングポリマが電気泳動中に溶け出さないように架橋処理をする必要があるということである。また、電気浸透流や電気泳動をイオン性物質の種類や濃度で制御することが可能であるので、緩衝液にイオン性物質などを加えることにより、同様の効果を奏することができる。

溝3の表面、分離マトリックス5（支柱4）の表面、及びカバー6の溝3を覆う部分の表面は、基板2の表面と同様に疎水性であっても、電気泳動セル1を使用することは可能である。一般に、代表的なエラストマやプラスチックは、表面処理をしなければ疎水性である。これらをそのまま使えば、毛細管現象で緩衝液を、溝3内あるいは分離マトリックス5内（支柱4の隙間）に満たすことはできない。したがって、この場合、緩衝液の中に電気泳動セル1を浸漬して脱気処理を行う必要がある。しかし、一旦、このようにして溝3内あるいは分離マトリックス5内に緩衝液を満たせば、この後本発明の効果を十分に発揮することができる。なお、電気泳動セル1が全体として疎水性であれば、例えばエラストマとプラスチックとを用いる場合、これらの密着性が高まる。さらに、生体分子の非特異的吸着が減少し、電気泳動セル1が汚れにくくなるといった効果も得られる。

（電気泳動セルの製造方法）

以下、電気泳動セル1の具体的な製造方法を説明する。電気泳動セル1は、およそ次のような手順で製造される。電気泳動セル1の材料はいずれも高分子材料であるが、これらの高分子材料は成形により加工される。高分子材料の成形方法としては、圧縮成形法、射出成形法、押出し成形法、吹込み成形法、鋳造成形法、うす物成形法などが知られているが、ナノメートル～サブミクロンのレベルの微細構造を成形することができれば、どのような方法を用いてもよい。この実施の形態では、次の2つの方法が用いられる。すなわち、1つは、微細加工したシリコン（Si）を鋳型として、エラストマをキャストリングして微細構造を転写するといった方法である。もう1つは、微細加工したシリコンの成形型に、ガラス転

移温度以上に加熱した熱可塑性ポリマを押し付けて微細構造を転写するといった方法である。

5 鋳型の材料としては、例えば、ガラス、シリコン、セラミック、金属、プラスチックなどが考えられるが、ナノメータ～サブミクロンのレベルのネガパターンを微細加工することができれば、どのようなものでもよい。鋳型を製作する方法としては、マスクを作製してドライエッチングで加工するといった方法や、レジストをそのままソングラフィにより微細加工するといった方法を用いることができる。ただ、この実施の形態では、剥離性を向上させるため、シリコンのエッチング技術を用いている。この方法は、ネガパターンの微細構造表面を滑らかにす  
10 ることができ、これにより剥離性や微細構造の転写能をより高めることができる。

(鋳型の製作)

以下、図 7 A～図 7 Gを参照しつつ、鋳型を製作する方法と、該鋳型を用いて、分離マトリックス 5 を含む溝 3 を備えた基板 2 (以下、「デバイス」という。)を製作する方法とを、より具体的に説明する。

15 まず、図 7 Aに示すように、シリコンウエハ 1 1 を準備する。続いて、図 7 Bに示すように、シリコンウエハ 1 1 の上面に感光性有機膜 1 2 を塗布する。次に、図 7 Cに示すように、感光性有機膜 1 2 を伴ったシリコンウエハ 1 1 の上に、光を通す領域 1 4 a と光を通さない領域 1 4 b とが所定のパターンで形成されたマスク 1 4 を配置する。そして、マスク 1 4 を介して感光性有機膜 1 2 の所定の領域に光 1 3 を照射し、現像液を用いて現像する。例えば感光性有機膜 1 2 として、  
20 感光した部分が溶解するいわゆるポジ型感光性有機膜を用いた場合は、光を通す領域 1 4 a に対応する部位では感光性有機膜 1 2 が除去され、穴部 1 5 が形成される。

次に、図 7 Dに示すように、シリコンウエハ 1 1 にエッチングを施す。エッチング手法としては、既存技術である誘導電磁結合プラズマ反応性プラズマエッチングを用いる。反応ガスとしては、フロロカーบอนを主体としたガスを用いる。  
25 このエッチングにより、感光性有機膜 1 2 に形成された穴部 1 5 に対応する部位、すなわち感光性有機膜 1 2 で覆われていない部位ではシリコンウエハ 1 1 がエッチングされ、凹部 1 6 が形成される。この後、感光性有機膜 1 2 をアセトンなど

の有機溶媒を用いて溶解させる。これにより、図 7 E に示すように、シリコンからなる鋳型 17 が得られる。

そして、この鋳型 17 を用いてデバイスを製作する。具体的には、まず、図 7 F に示すように、シリコンからなる鋳型 17 に、シリコーンラバー溶解液 18 を塗布する。なお、鋳型 17 の表面には、予めシランカップリング剤を塗布するなどして、疎水性を保つ処理を施しておく。この疎水性を保つ処理により、後記の剥離工程における、シリコーンラバーと鋳型 17 との離型性を向上させることができる。

シリコーンラバー溶解液 18 を室温で固化させた後、固化物を鋳型 17 から剥離する。これにより、シリコーンラバーからなるデバイス（シリコーンラバー構造体）、すなわち分離マトリックス 5 を含む溝 3 を備えた基板 2 が得られる。さらに、図 7 G に示すように、デバイスに、所定の位置に試料注入口（貫通穴）を備えたカバー 6 を配置する。なお、カバー 6 としては、ガラス基板やプラスチック基板を用いることができる。そして、カバー 6 をデバイスに圧着することにより、カバー 6 とシリコーンラバーからなるデバイスとが密着した電気泳動セル 1 が完成する。シリコーンラバーは粘着性を有するので、カバー 6 をデバイスに圧着するだけで、ガラス基板やプラスチック基板からなるカバー 6 とデバイスとをシールすることができ、液漏れの問題は生じない。

このように、非常に簡便な手法で、鋳型 17 ないし電気泳動セル 1 を製造することができる。また、シリコンからなる鋳型 17 は、繰り返して使用することができるので、電気泳動セル 1 の生産性や生産コストを改善することができる。

上記デバイス、すなわち分離マトリックス 5 を含む溝 3 を備えた基板 2 は、上記の製造方法と異なる手法で製造してもよい。例えば、シリコンからなるプレス型に熱をかけながら、プラスチック板をプレス型に押し付けて加圧成形すれば、プラスチックからなるデバイスを得ることができる。この後、デバイスにカバー 6 を取り付ければ、電気泳動セル 1 が完成する。このようにプラスチックを用いたデバイスないし電気泳動セル 1 では、シリコーンラバーを用いた場合に比べてその強度が改善される。

また、シリコンからなる鋳型 17 に代えて、厚膜の感光性有機膜からなる鋳型

を用いてもよい。この場合、例えば厚膜の感光性有機膜を光照射によりパターンニングし、パターンニングされた感光性有機膜をそのまま鋳型として用いればよい。この手法によれば、図7Dに示すシリコンウエハ11のエッチング工程を省くことができるので、生産性をさらに向上させることができる。

5 (PDMSチップの製造方法)

以下、代表的なシリコンラバーであるPDMS（ポリジメチルシロキサン）をデバイスの材料として用いて、実際に電気泳動セル1を製造した過程ないし結果を説明する。この製造方法では、シリコンウエハからなるネガパターンの鋳型は、微細加工技術により形成された。この鋳型は、分離マトリックスを含む溝に  
10 対応する型面を有している。この鋳型を、直径90cmのプラスチックシャーレ内に配置し、その上部からPDMSを注入した。PDMSは、東レ・ダウコーニング社から購入したもの（商標名「SYLGARD」）を用いた。

シリコンウエハ（シリコン基板）には、あらかじめシランカップリング剤で表面処理を行った。シリコンウエハの表面に、アセトニトリルに4%のジメチルジクロロシランを溶解させた溶液を塗布した後、該シリコンウエハに、100℃で  
15 30分間、乾燥処理を施した。100mlのビーカーに約40mlのPDMSを入れ、さらに4mlのキャタリストを加えてよく混合した後、このビーカーをデシケータに入れて、30分間、真空ポンプで脱気した。

この後、シリコンウエハが入ったプラスチックシャーレに、20mlの脱気したPDMSを入れ、このプラスチックシャーレをデシケータに入れて、30分間、  
20 真空ポンプで脱気した。分離マトリックスを含む溝から気泡を十分に追い出した後、デシケータに空気を入れて、プラスチックシャーレを取り出した。そして、脱気済みのPDMSを、シリコンウエハの上に、約5～7mmの厚さで積層（重層）した。PDMSが積層されたプラスチックシャーレを、40度の恒温ボックスに入れてPDMSを重合させた。48時間以上経過した後、プラスチックシャ  
25 ーレを取り出した。そして、必要とする分離マトリックスの部分の周りに、カッターで切り込みを入れ、重合したPDMSを、シリコンウエハからなる鋳型からゆっくり剥離して、PDMSチップを得た。

PDMSチップ（幅5mm、長さ20mm、厚さ5mm）に、カバーとして同

一寸法（幅5mm、長さ20mm、厚さ1mm）のポリスチレン板をかぶせた。密着性が悪い場合は、PDMSチップの溝側表面に、酸素プラズマ処理（酸素圧力1.0kPa、励起電力100w、処理時間5分）や紫外線処理（20w紫外線ランプ、処理時間20分、距離10cm）を施して、密着性を高めればよい。

5 カバーには、直径1mmの試料注入口（穴）を、溝に沿って2つ形成した。そして、白金線（直径0.2mm）からなる電極を、先端近傍部が試料注入口を通して溝内の緩衝液に直接触れるように配線した（図1参照）。なお、白金蒸着により電極を形成した場合も、白金線を用いた場合と同様の効果を奏するのはもちろんである。

10 DNAの電気泳動用の緩衝液としては、TBE緩衝液（89mM Tris-borate、2mM EDTA）を用いた。PDMSチップに酸素プラズマ処理を施した場合、PDMSチップ表面は親水性となるので、緩衝液は分離マトリックスの支柱の間隙に、毛管現象により侵入する。このような親水化処理を行わない場合は、一方の試料注入口から溝内に緩衝液を供給しつつ、他方の試料注入口を注射器で吸引し、緩衝液を分離マトリックスに充填すればよい。あるいは、緩衝液  
15 の中にPDMSチップを浸漬し、真空デシケータの中で減圧して、緩衝液を分離マトリックスに充填すればよい。後者の場合、カバーは脱気後にPDMSチップに慎重にかぶせる必要がある。

#### （電気泳動の実施）

20 以下、本発明にかかる電気泳動セルを用いて実際に電気泳動を行った過程及び結果を説明する。生体分子試料としてDNA試料を用いた。DNA試料としては、λDNAと、T4ファージDNAと、λDNAを制限酵素Xba-Iで約半分に切断した1/2λDNAとを用いた。これらのDNAの塩基数は、それぞれ、48500、166000、24000であった。これらのDNAをTBE緩衝液  
25 1μlあたり0.05μg含み、かつ蛍光染色試料としてYO-PRO-1（モレキュラープローブ社製）、サイバーグリーン（宝酒造社製）又はサイバーゴールド（宝酒造社製）を1μM含むDNA混合液を試料として用いた。この試料を、1回の電気泳動あたり1μL使用した。そして、カバーに形成された2つの試料注入口のいずれか一方に試料を注入して電気泳動を行った。電気泳動用の電源は、



0～1000V、1A定格のATTOクロスパワー1000を用いた。この電源で、白金線からなる電極の両端に50～100V/cmの電圧を印加した。電流は10mA以下であった。DNAは、TBE緩衝液中で負に帯電しているので、正極である電極に向かって泳動する。溝の長さが1cmの場合、電気泳動時間を  
5 2～5分間とした。

(電気泳動の観察)

以下、電気泳動の観察手法の一例を説明する。図8は、DNAの電気泳動を観察し、又は記録するための電気泳動評価装置の概略構成を示している。

図8に示すように、この電気泳動評価装置は、蛍光顕微鏡20を備えている。  
10 この蛍光顕微鏡20には、サンプル21（電気泳動セル）を載せるサンプル台22と、励起側フィルタ（図示せず）を備えた光源23と、ダイクロイックミラー24と、DNAを観察するための観察窓25と、光路を切り替える切り替えミラー26と、光を電気信号に変換する光電子増倍管27と、ビデオカメラ28（高感度CCDカメラ）とが設けられている。また、この電気泳動評価装置は、画像  
15 を記録するVTR29（ビデオ・テープ・レコーダ）と、パーソナルコンピュータ30と、ディスプレイ31とを備えている。

蛍光顕微鏡20においては、光源23から放射され、励起側フィルタにより波長が420～490nmに調整された光L1は、ダイクロイックミラー24によって反射された後、サンプル21に照射される。その結果、サンプル内のDNA  
20 は蛍光を放射する。この蛍光は、吸収フィルタ（図示せず）によって波長が520nmの光L2に調整される。この光L2は、ダイクロイックミラー24によって、観察窓25に向かう光L3と、光電子増倍管27又はビデオカメラ28に向かう光L4とに分割される。

かくして、観察窓25を覗くことにより、蛍光を発しているDNA分子が、電気泳動により分離マトリックス内（支柱の隙間）を通過する様子を観察することが  
25 ができる。光L4は、切り替えミラー26で光路を切り替えることにより、光電子増倍管27又はビデオカメラ28に入力される。光電子増倍管27は、この光L4を電気信号に変換して、外部機器に出力する。高感度CCDカメラであるビデオカメラ28は、DNA分子が電気泳動により分離マトリックス内を通過する

様子を撮影し、得られた画像をVTR 29に送る。VTR 29はこの画像を記録する。VTR 29に記録されている画像は、パーソナルコンピュータ 30を用いて解析することができ、またディスプレイ 31に表示することができる。

(塩基数と移動速度との関係)

- 5       以下、DNAの塩基数と、電気泳動によるDNAの移動速度（電気泳動速度）との関係を説明する。

図9は、次の条件における、DNAの塩基数とDNAの移動速度との関係を示している。

- 溝の幅：200  $\mu\text{m}$   
10       溝の深さ：10  $\mu\text{m}$   
分離マトリックスの長さ：10 mm  
支柱の形状：円柱、  
支柱の直径：15  $\mu\text{m}$   
支柱の隙間：約1  $\mu\text{m}$   
15       支柱の配置密度：4000 個/ $\text{mm}^2$   
電圧：50 V/cm  
緩衝液：TBE緩衝液  
DNA濃度：50 ng/ $\mu\text{l}$   
染色剤：サイバークリーン1 mM

- 20       図9から明らかなおとおり、電気泳動によるDNAの移動速度は、DNAの塩基数に依存して顕著に変化している。したがって、人工的な支柱と隙間とからなる本発明にかかる分離マトリックスは、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルの網目と同様の効果を奏し、これらのゲルに代替することができることが分かる。

(DNAの移動モデル)

- 25       図10は、円柱形の支柱4と、支柱4の隙間を通り抜けるDNAの運動モデルとを示している。図10に示すように、障害物である支柱4の隙間が、この隙間を通過するDNAの運動に対して、エントロピー障壁の役割を果たしていると考えられる。すなわち、球状のDNA分子は、支柱4の隙間を通過する際、一時的に、熱力学的に低エントロピーのコンフォメーションをとり、変形して隙間を通り抜け

る。これが、電気泳動によるDNAの移動速度に影響していると考えられる。

(本発明にかかる電気泳動セルの応用例)

以上、本発明にかかる基本的な電気泳動セルについて、その形状、材質、製造方法、DNAの分離の原理、DNAの運動モデル等を詳細に説明したが、以下では、このような基本的な電気泳動セルを応用したDNA分取装置（生体試料分取装置）を説明する。

(DNA分取装置1：応用例1)

図11は、本発明にかかる電気泳動セルを応用した1つのDNA分取装置を示している。図11に示すように、このDNA分取装置では、分離マトリックス5が、支柱の配置密度ないし支柱の間隙（ピラー間隙）が異なる5つのピラーエリアA～Eに区分されている。ここで、ピラーエリアA、B、C、D、Eは、この順に、支柱の配置密度が大きくなっている（支柱の間隙が小さくなる）。そして、このDNA分取装置は、陰極を伴った1つの試料注入口33と、それぞれピラーエリアA～Eに設けられ陽極を伴った5つの試料回収口34a～34eとを備えている。

かくして、このDNA分取装置では、例えば、分子量の異なるDNAを含むサンプルを試料注入口33に供給すれば、分子量が大きいDNAは、支柱の配置密度が大きいピラーエリア（ピラーエリアE側）を通過しにくいので、支柱の配置密度が小さいピラーエリア（ピラーエリアA側）に多く集まり、このピラーエリアの試料回収口から回収される。したがって、ピラーエリアA、B、C、D、Eに存在するDNA、ないし試料回収口34a～34eで回収されるDNAは、後者ほど分子量が小さくなる。よって、サンプル中のDNAを、分子量に応じて5種類に分取（分画）することができる。

(DNA分取装置2：応用例2)

図12A及び図12Bは、本発明にかかる電気泳動セルを応用したもう1つのDNA分取装置を示している。図12A及び図12Bに示すように、このDNA分取装置では、分離マトリックス5は、平面視で、縦方向（X1-X2方向）及び横方向（Y1-Y2方向）について2次的に互いに離間して配置された多数の角柱状の支柱4で構成されている。また、このDNA分取装置は、陰極を伴っ

た1つの試料注入口35と、それぞれ陽極を伴った6つの試料回収口36a～36fとを備えている。

この分離マトリックス5では、ある支柱4と、X2側でこの支柱4とX1-X2方向に隣り合う2つの支柱4との間に形成されY1-Y2方向に伸びる間隙  
5 において、Y1側に位置する間隙38は広く、Y2側に位置する間隙39は狭くなっている。他方、Y1-Y2方向に隣り合う支柱4間でX1-X2方向に伸びる間隙40は、すべて広がっている。なお、X1-X2方向に伸びる間隙40のX2側の端部と、Y1-Y2方向に伸びる両間隙38、39との接続部には、略矩形の空間部41が形成されている。

10 かくして、このDNA分取装置では、例えば、分子量の異なるDNAを含むサンプルを試料注入口35に供給すれば、分子量が大きいDNAは、狭い間隙39を通過することができないので、例えばR1で示すように、Y1-Y2方向（横方向）に関しては、Y1方向には移動せず、Y2方向にのみ移動してゆく。これ  
15 に対して、分子量が小さいDNAは、Y1方向及びY2方向のどちらへでも移動することができる。しかし、前記のとおり、分子量が大きいDNAがほとんどY2方向に移動するので、その影響により、分子量が小さいDNAは、例えばR2で示すように、Y1方向に移動する傾向が強くなる。したがって、分離マトリックス5内において、試料回収口36a～36fで回収されるDNAは、後者ほど  
20 分子量が小さくなる。よって、サンプル中のDNAを、分子量に応じて6種類に分取（分画）することができる。

#### （医療診断への応用）

本発明にかかる電気泳動セルないしDNA分取装置（生体試料分取装置）は、医療診断あるいは遺伝子多型検出に応用することができる。例えば、ヒトの遺伝子には、個体ごとに塩基配列にわずかな違い（遺伝子多型）が存在する。そして、  
25 その違いは、遺伝子制御領域やイントロン領域、あるいは蛋白質などをコードしている領域にあるといわれている。遺伝子制御領域やイントロン領域の違いは、遺伝子の発現量が個体によって異なることを示している。また、蛋白質などをコードしている領域は、酵素の活性が個体によって異なることを示している。個体差は遺伝子多型の組合せで決まるともいわれている。例えば、薬の代謝には個体

差があり、これが薬の薬効や副作用に深く関連している。すなわち、これらの薬効や副作用には、個体が持つ薬代謝遺伝子群の遺伝子多型が大きく影響している。

5 遺伝子多型には種々のものがあるが、現在、最も数が多く、大量解析が容易であるといわれているのは、1塩基多型（SNPs：single nucleotide polymorphisms）である。SNPsは個体間で1遺伝子暗号（1塩基）が他の塩基に置き換わっている部分で、ヒトのゲノムの中には300～1000万個あると予想されている。そのため、薬代謝遺伝子群の遺伝子多型情報は、医薬品の開発、薬物の有効利用、副作用防止等に役立つであろうと期待されている。

10 SNPs解析手法としては、現在、制限酵素法、SSCP（single-strand conformation polymorphisms）解析法、直接シーケンシング法、電気化学検出法などが知られている。この中で電気泳動により分析を行うものは、制限酵素法、SSCP解析法、直接シーケンシング法である。これらの迅速な分離や検出に、本発明にかかる分離マトリックスを利用した電気泳動セルを応用することができる。本発明にかかる電気泳動セルを用いることにより、少量のサンプルで迅速に  
15 SNPsを検出することができる。この中でも、SSCP法は、PCR技術を利用して増幅し、立体構造の変化を電気泳動で検出するので、本発明に好適である。

本明細書では、DNAや生体分子をターゲットにしているが、ターゲットは生体分子に限られるわけではない。環境化学物質や高分子化合物の分離や検出にも応用することができる。さらに、最近話題にのぼっている化学マイクロデバイス  
20 やLab on a chipなどのマイクロ流路における分離や検出にも、この分離マトリックス及びその製造方法が役立つものと予想される。

以上、本発明は、その特定の実施の形態に関連して説明されてきたが、このほか多数の変形例及び修正例が可能であるということは当業者にとっては自明なことであろう。それゆえ、本発明は、このような実施の形態によって限定されるもの  
25 ではなく、添付の請求の範囲によって限定されるべきものである。

#### 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明にかかる電気泳動セル等の生体分子分離セル及びその製造方法、並びに、DNA分取装置ないし生体試料分取装置は、とくにDNA等の

生体分子の検出又は分取に有用であり、医療検査装置ないし診断装置として用いるのに適している。

## 請求の範囲

1. 液体試料中の生体分子を分離又は検出する生体分子分離セルであって、  
表面に溝が形成された基板と、
- 5 上記溝の一部の領域に配置され、支柱間の間隙の最も狭い部分が0.1～5  $\mu$ mである複数の支柱からなる分離マトリックスと、  
上記基板の表面と上記溝とを覆い、かつ上記支柱の上面と密着するカバーと、  
溝内を満たす緩衝液と、  
緩衝液に直接接触して該緩衝液に電圧を印加する少なくとも2つの電極とを備
- 10 えていて、  
上記基板と上記分離マトリックスとが、高分子材料で形成されている生体分子分離セル。
2. 電気泳動により生体分子を分離するようになっている請求項1に記載の生体分子分離セル。
- 15 3. 上記支柱の横断面の形状が円、長円、多角形、又は角部を丸めもしくは切り取った多角形である請求項2に記載の生体分子分離セル。
4. 上記基板及び上記分離マトリックスのうちの少なくとも一部が、エラストマ又はプラスチックで形成されている請求項2に記載の生体分子分離セル。
5. 上記エラストマがシリコンゴムである請求項4に記載の生体分子分離セル。
- 20 6. 上記プラスチックが、アクリル系樹脂、ポリスチレン系樹脂又はポリカーボネート系樹脂である請求項4に記載の生体分子分離セル。
7. 上記溝が、20～1000ミクロンの幅を有し、1～50  $\mu$ mの深さを有し、かつ0.1～50mmの長さを有する請求項2に記載の生体分子分離セル。
- 25 8. 上記支柱の配置密度が1000個/mm<sup>2</sup>以上である請求項2に記載の生体分子分離セル。
9. 上記溝に生体分子試料を注入するための試料注入口が上記カバーに設けられ、上記分離マトリックスが、上記試料注入口近傍に、その他の領域よりも支柱の配置密度が低い領域又は支柱が存在しない領域を有する請求項2に記載の生体

分子分離セル。

10. 表面に溝が形成された基板と、上記溝の一部の領域に配置された複数の支柱からなる分離マトリックスとを備えた、液体試料中の生体分子を分離又は検出する生体分子分離セルの製造方法であって、

5 シリコン基板、ガラス基板又は高分子基板に微細加工を施して、上記溝及び上記支柱に対応するネガパターンを備えた鋳型を形成する工程と、

上記鋳型に、液状のエラストマもしくはプラスチック、又はエラストマもしくはプラスチックの原料となるモノマもしくはプレポリマを流し込んで固化させる工程と、

10 固化物を鋳型から分離して、上記基板と上記分離マトリックスとを備えた生体分子分離セルを得る工程とを含んでいる生体分子分離セルの製造方法。

11. 表面に溝が形成された基板と、上記溝の一部の領域に配置された複数の支柱からなる分離マトリックスとを備えた、液体試料中の生体分子を分離又は検出する生体分子分離セルの製造方法であって、

15 シリコン基板、ガラス基板又は高分子基板に微細加工を施して、上記溝及び上記支柱に対応するネガパターンを備えた型を形成する工程と、

ガラス転移温度以上に加熱したプラスチックを上記型に押し付けた後、温度を低下させて硬化させる工程と、

20 硬化物を型から分離して、上記基板と上記分離マトリックスとを備えた生体分子分離セルを得る工程とを含んでいる生体分子分離セルの製造方法。

12. 表面に溝が形成された基板と、

上記溝の一部の領域に配置され、支柱間の間隙の最も狭い部分が $0.1 \sim 5 \mu\text{m}$ である複数の支柱からなる分離マトリックスと、

25 上記基板の表面と上記溝とを覆い、かつ上記支柱の上面と密着するカバーと、溝内を満たす緩衝液と、

緩衝液に直接接触して該緩衝液に電圧を印加する少なくとも2つの電極とを備えていて、

上記基板と上記分離マトリックスとが高分子材料で形成され、

上記溝内に供給されたDNAを含む液体試料から、該DNAの特性及び構造に



基づいて、該DNAを分取又は分画するようになっているDNA分取装置。

図 1

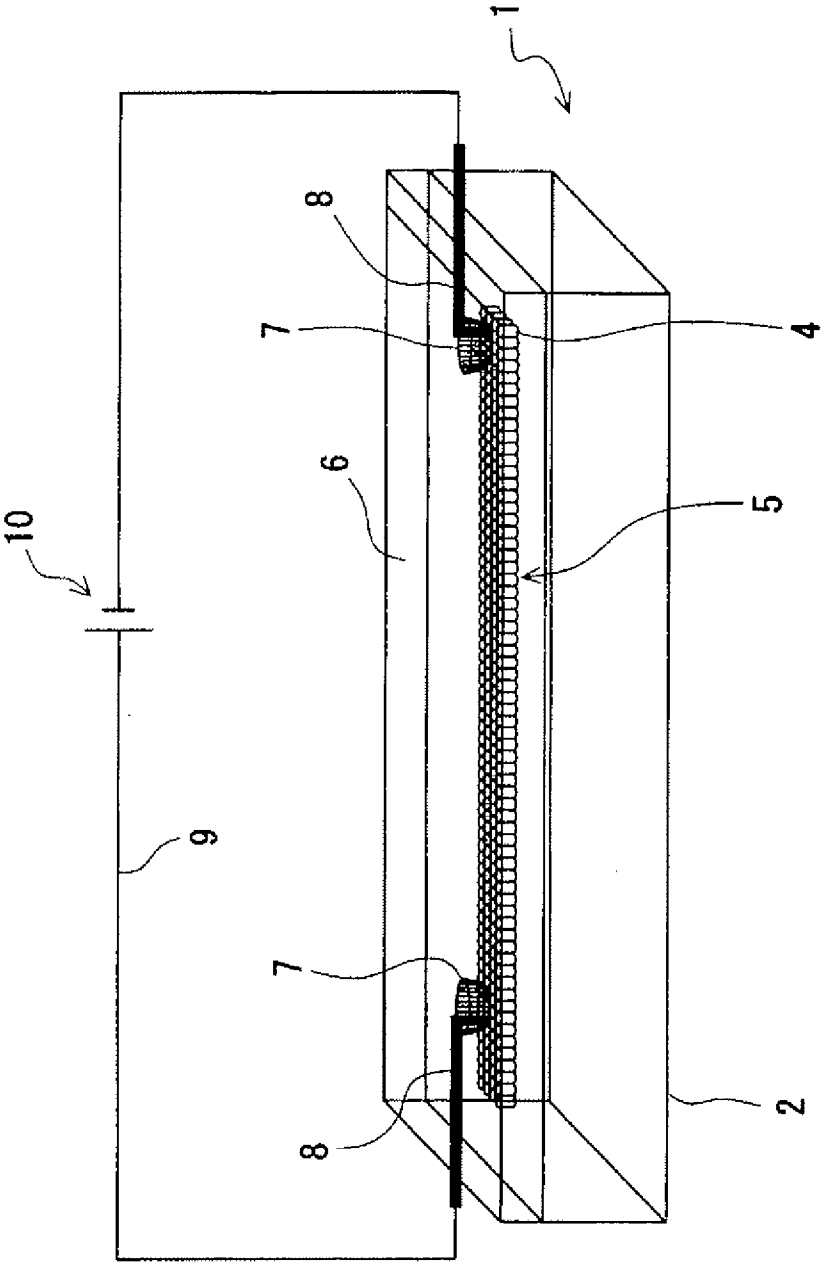


図 2

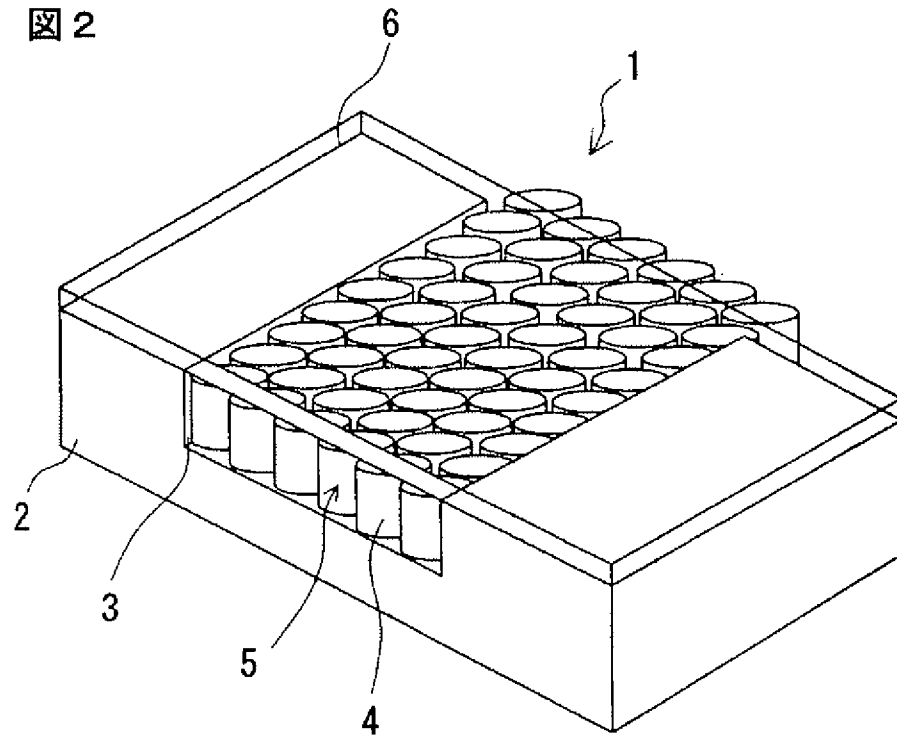


図 3

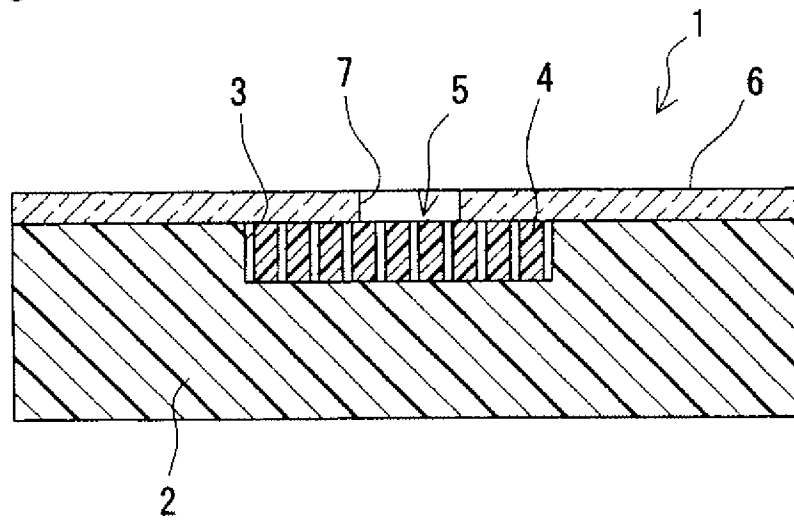


図 4 A

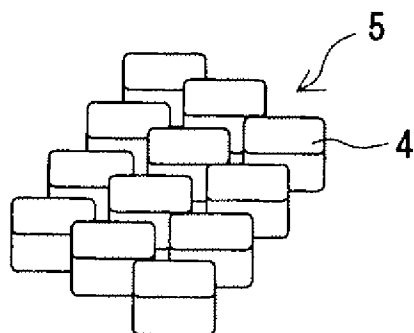


図 4 B

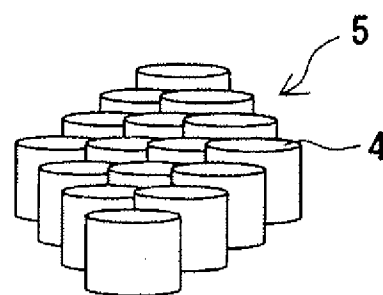


図 4 C

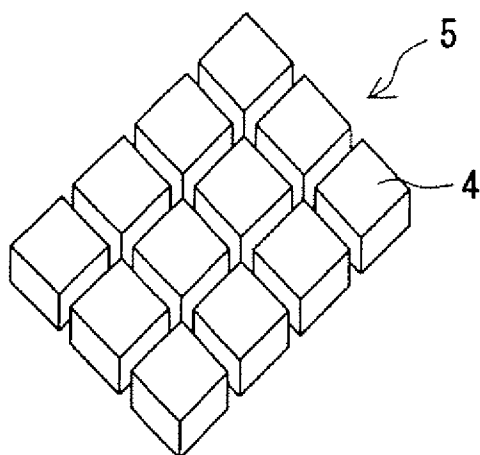


図 4 D

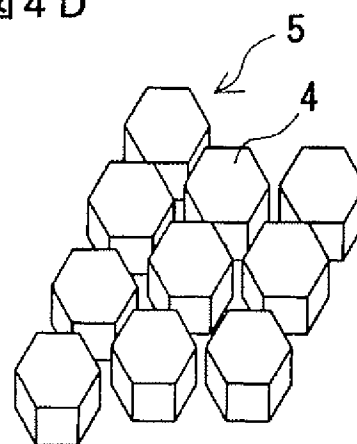


図 4 E

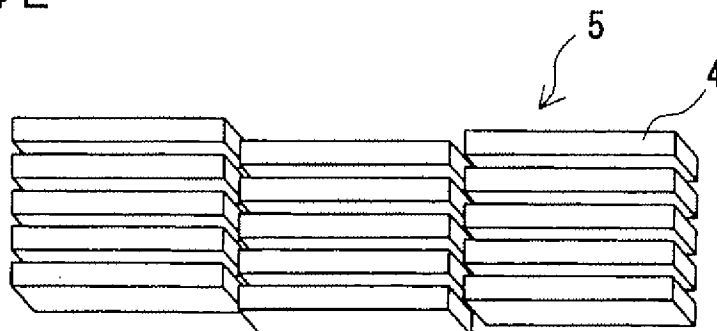


図 5 A

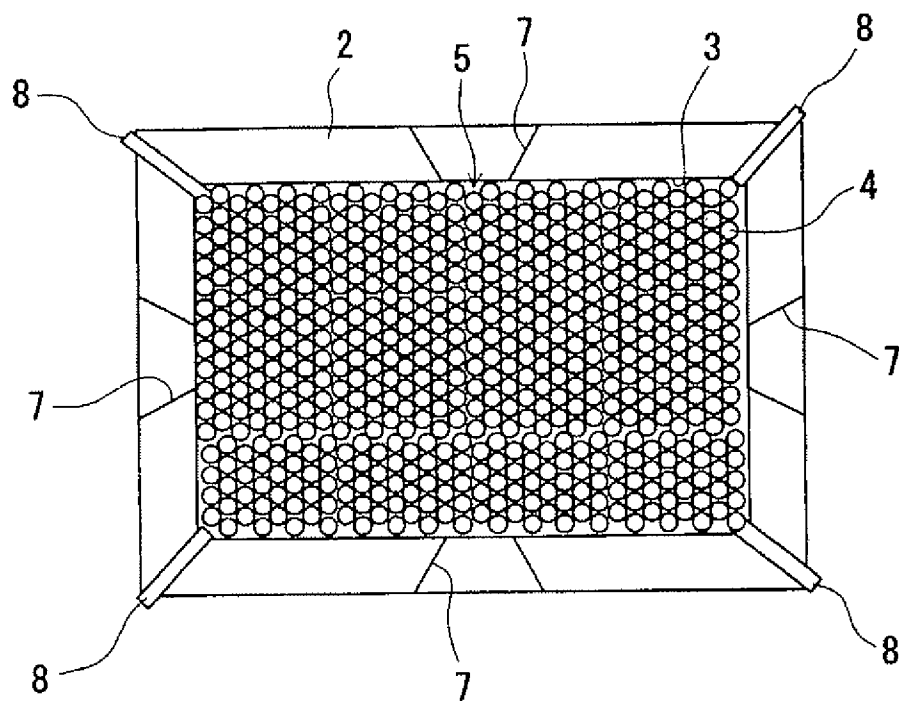


図 5 B

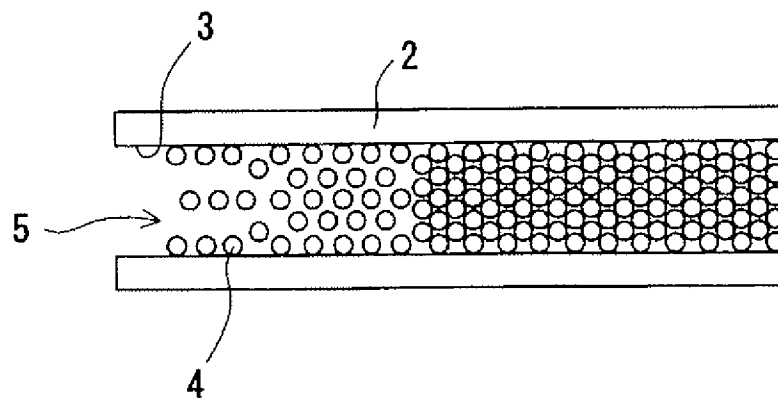


図 5 C

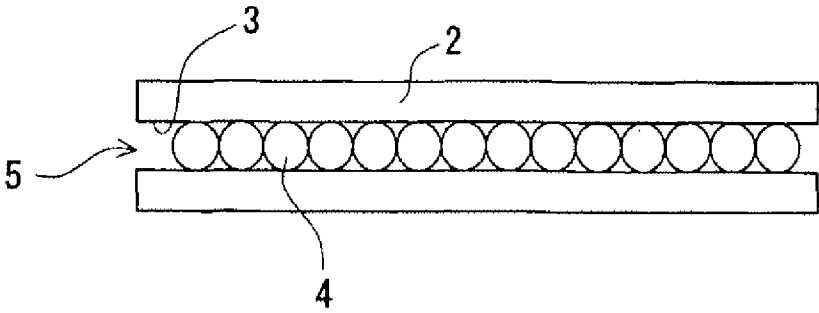


図 5 D

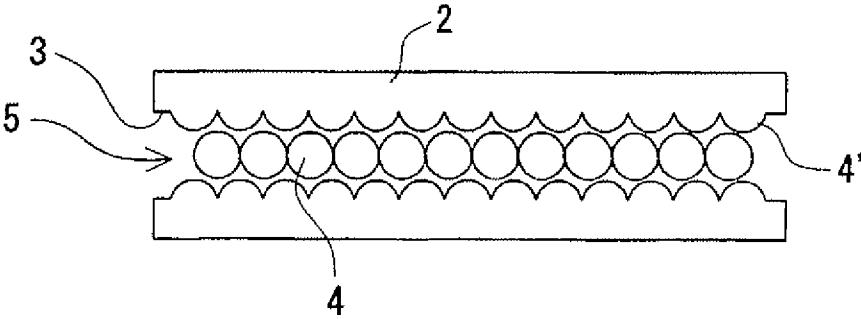
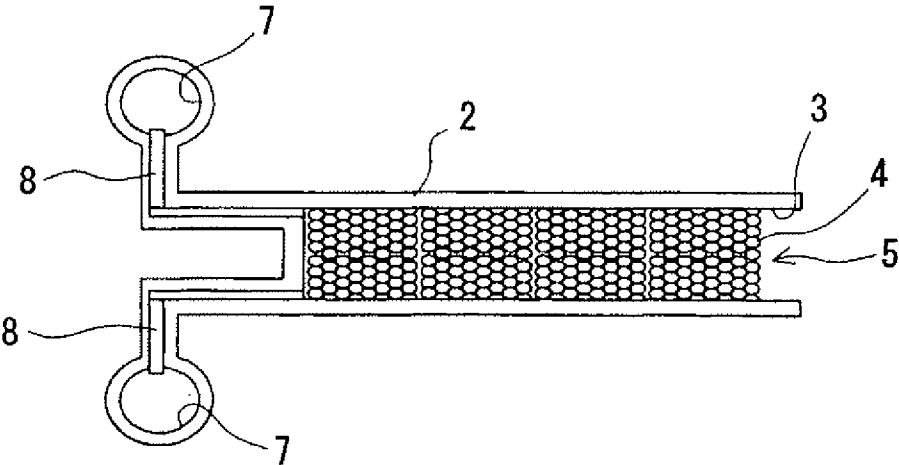


図 5 E



6/12

図 6 A

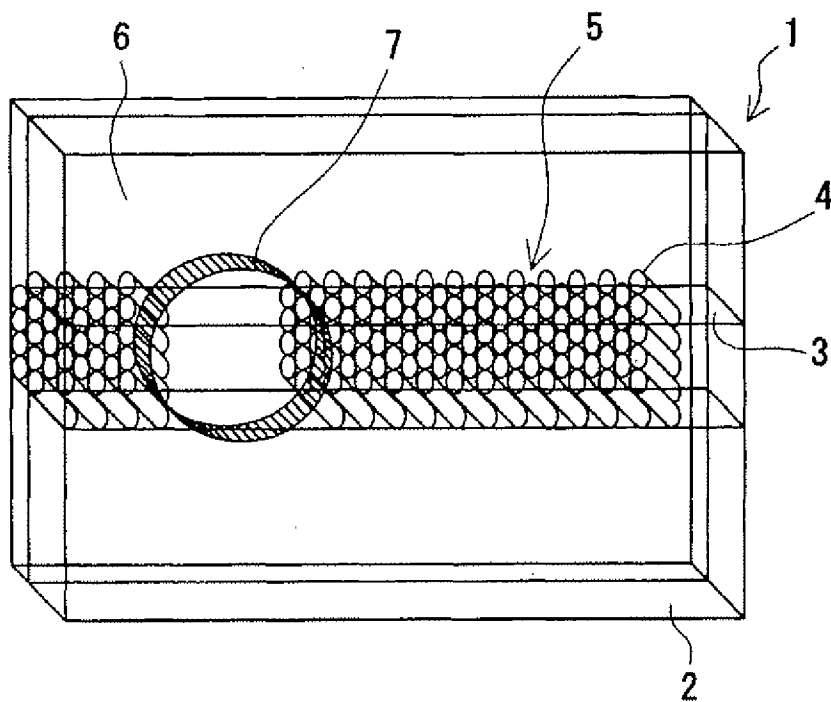


図 6 B

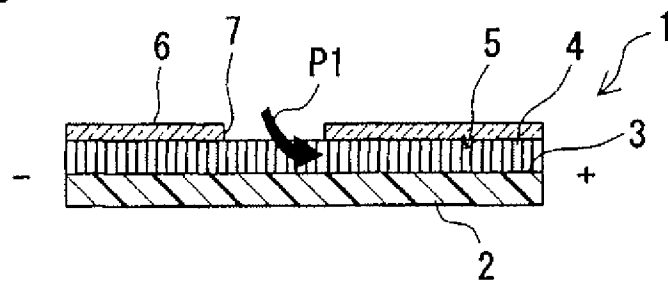


図 6 C

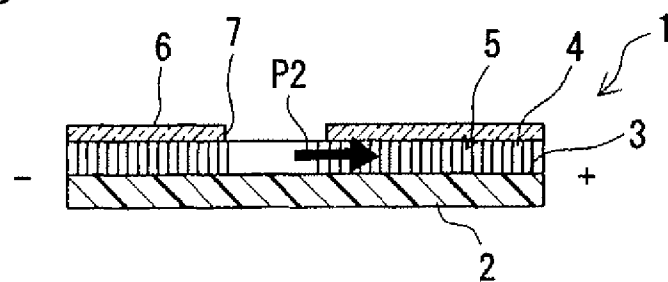


図 7 A

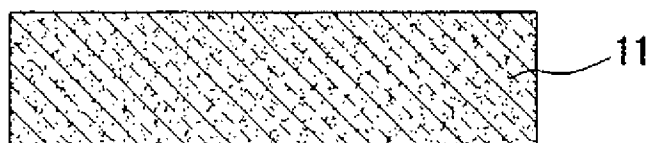


図 7 B

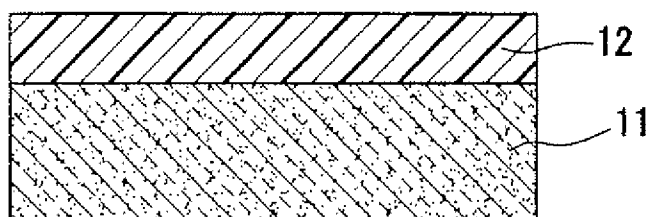
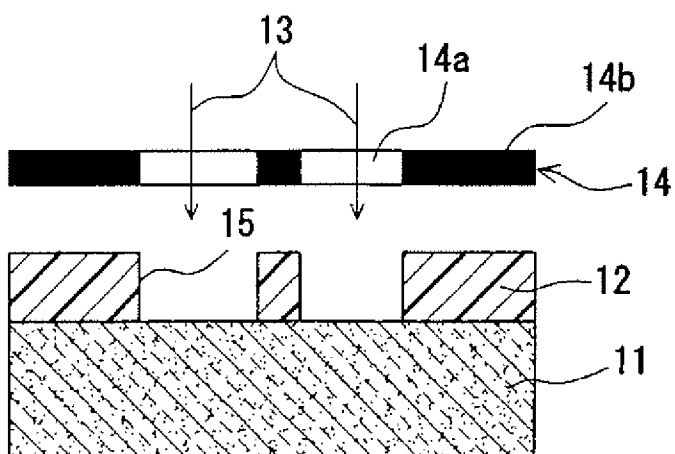


図 7 C





8 / 12

図 7 D

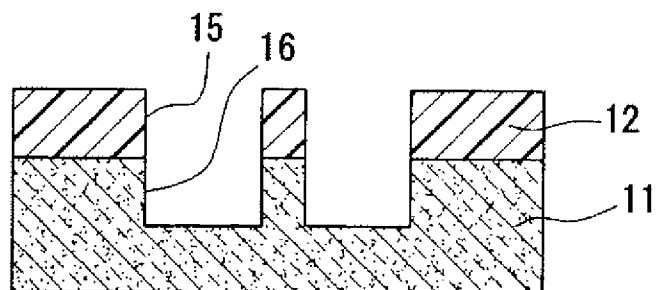


図 7 E

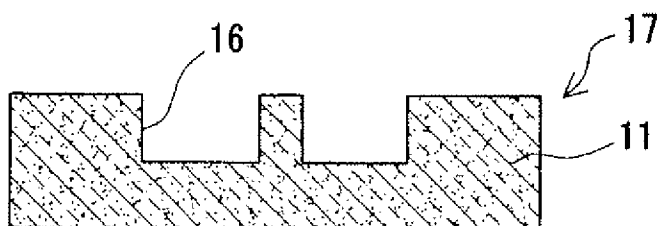


図 7 F

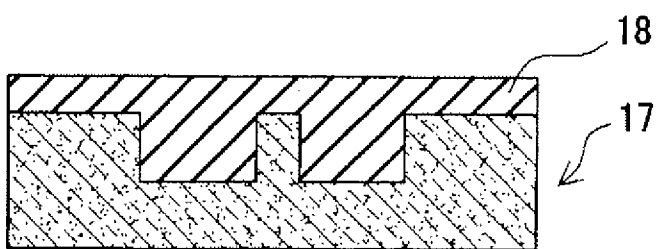


図 7 G

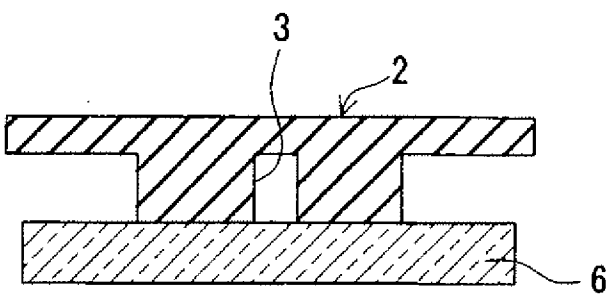


図 8

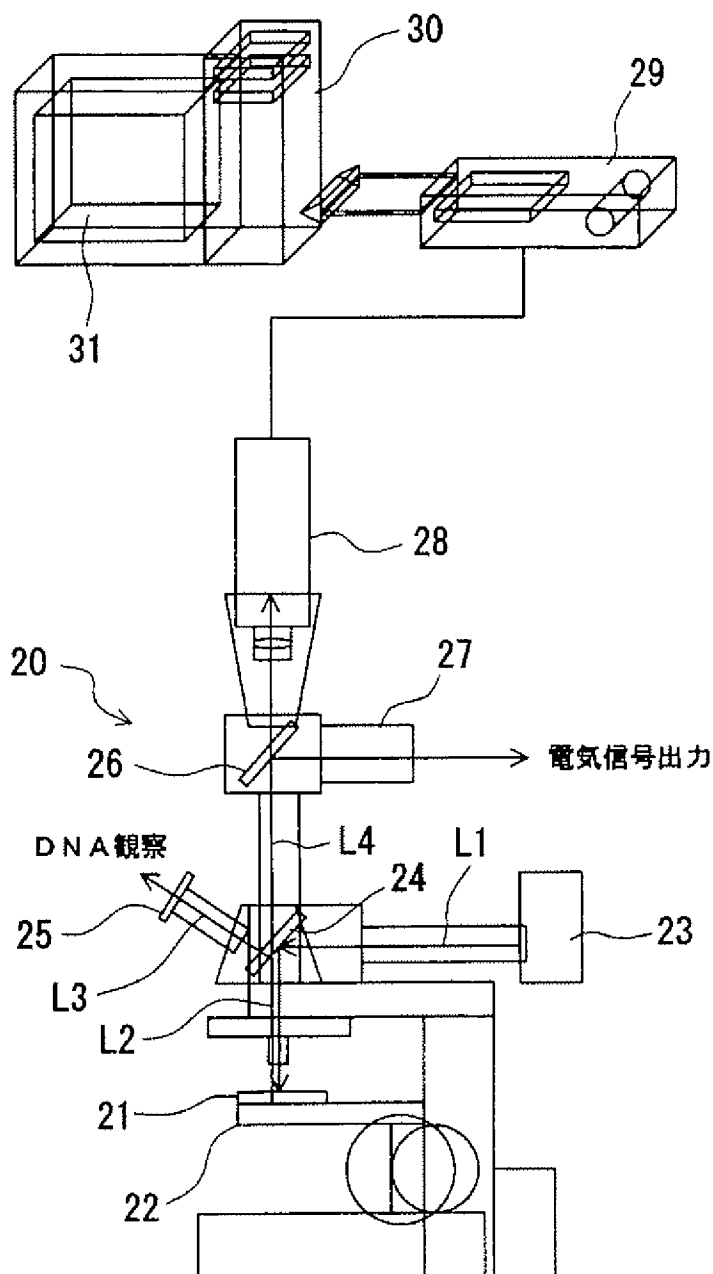


図 9

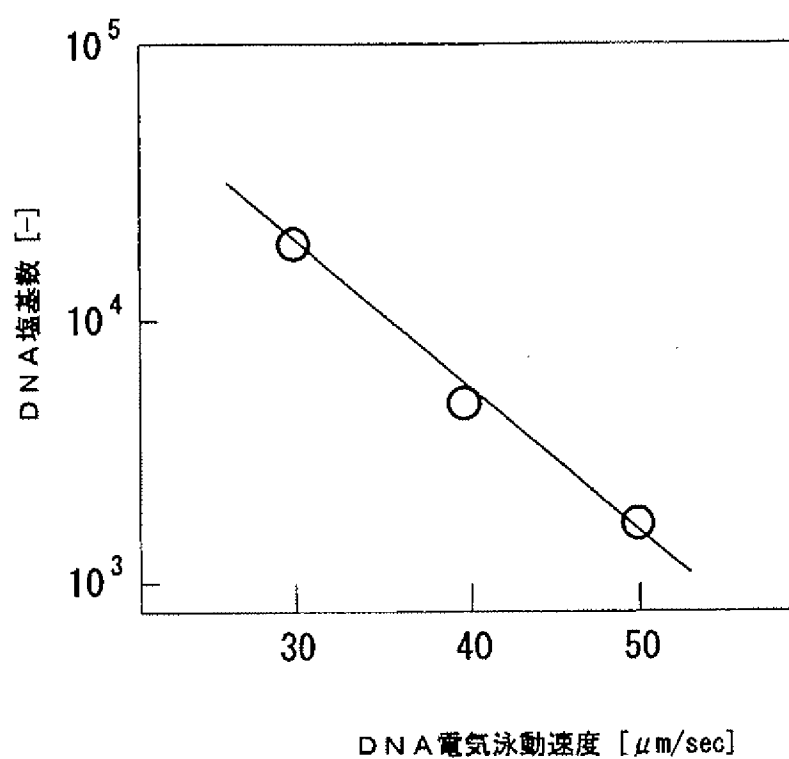


図 10

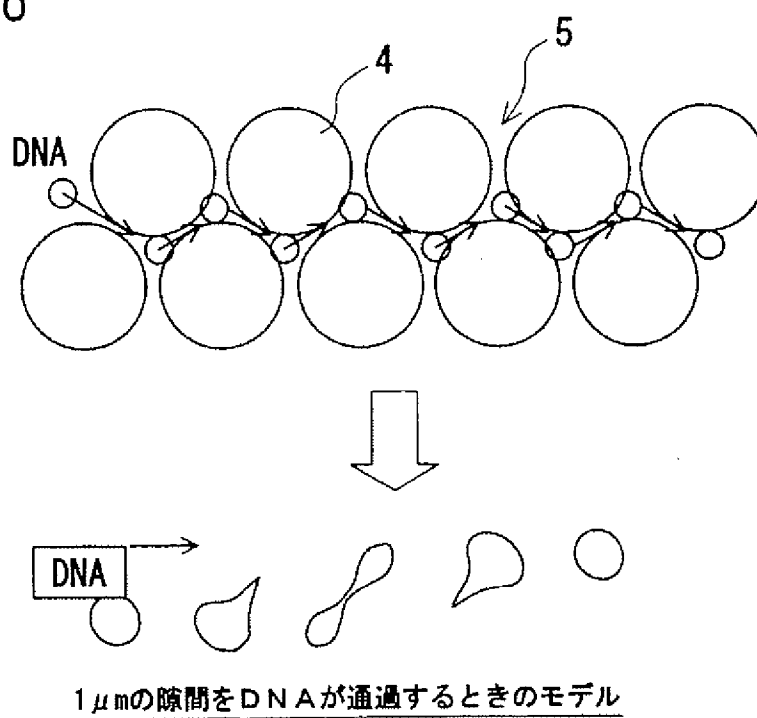


図 1 1

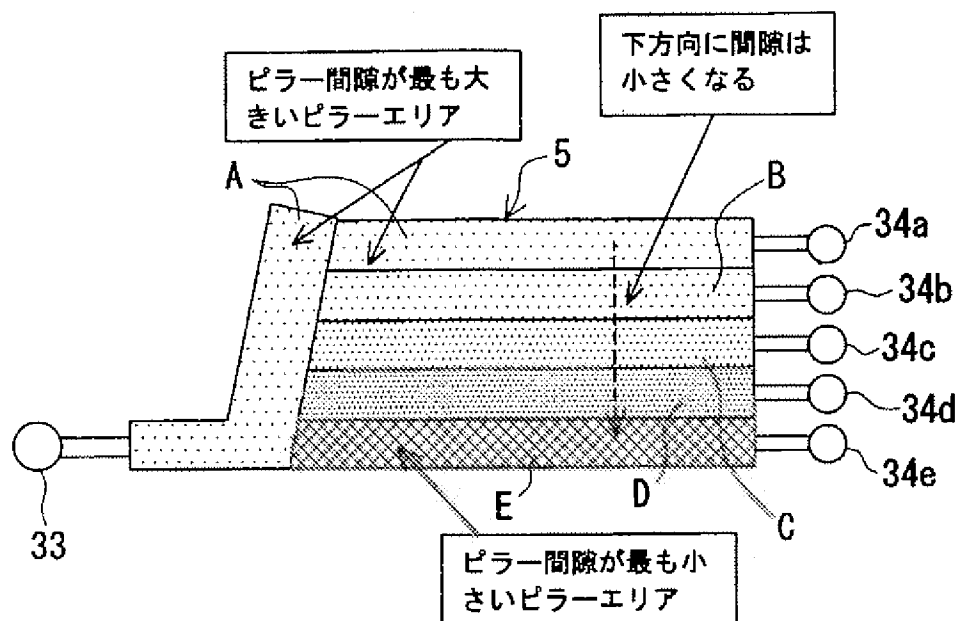


図 1 2 A

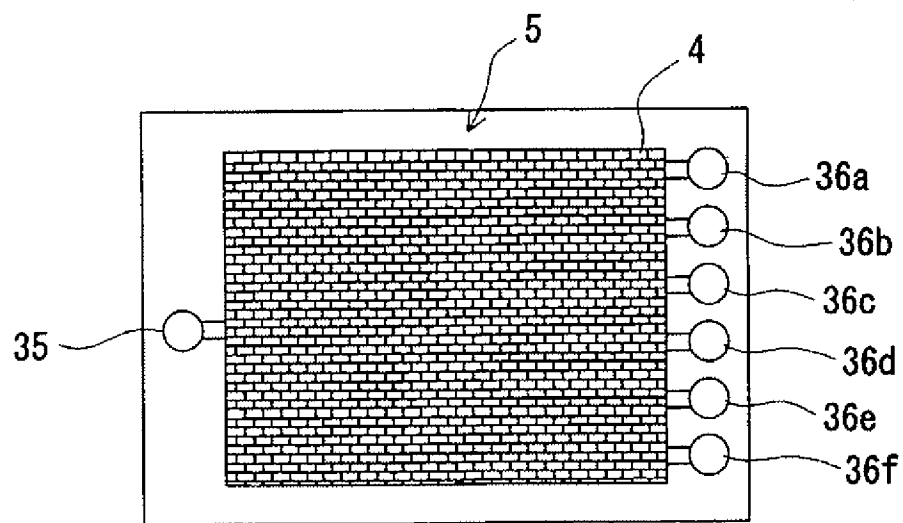
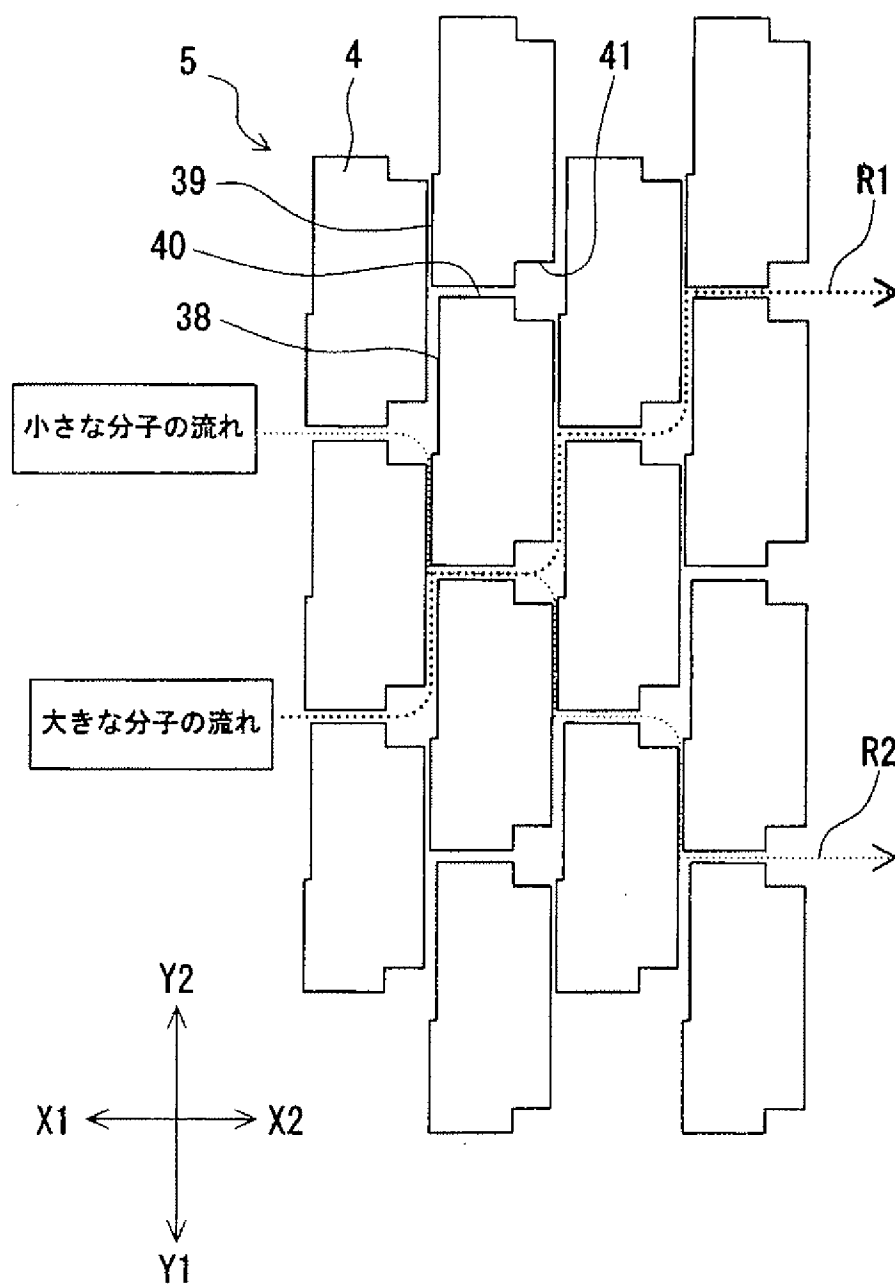


図 12 B



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07044

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl.<sup>7</sup> G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> G01N27/447, G01N1/10-1/04, G01N35/06-35/08, B01D57/02,  
G01N30/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiroshi OHJI, Shin'ichi IZUO, Patric J. French, Kazuhiko TSUTSUM, Pillar Structures with the Space of Sub-Microns Fabricated by the Macroporous Based Micromachining. The 11th international conference on solid-state sensors and actuators, Munich, germany, 10 to 14 June, 2001 (10-14.06.01), Transducers'01 Eurosensors XV, pages 1132 to 1135	1-12
A	JP 9-504362 A (British Technology Group USA Inc.), 28 April, 1997 (28.04.97), Full text; all drawings & WO 94/29707 A1 & CA 2164720 A & US 5427663 A1 & EP 711412 A & US 5837115 A1	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
08 August, 2002 (08.08.02)

Date of mailing of the international search report  
03 September, 2002 (03.09.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07044

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6156273 A (Prude Research Corp.), 05 December, 2000 (05.12.00), Full text; all drawings & WO 98/54568 A1	1-12
A	JP 11-508042 A (Visible Genetics Inc.), 13 July, 1999 (13.07.99), Full text; all drawings & AU 6271896 A & AU 6274696 A & WO 96/42012 A1 & WO 96/42013 A1 & CA 2222628 A & CA 2226405 A & EP 830594 A & EP 830595 A & US 6110339 A1 & US 6176990 B1 & US 6261430 B1	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> G01N27/447		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> G01N27/447, G01N1/10-1/04, G01N35/06-35/08 B01D57/02, G01N30/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2002年 日本国登録実用新案公報 1994-2002年 日本国実用新案登録公報 1996-2002年		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JICSTファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Hiroshi Ohji, Shinichi Izuo, Patric J. French, Kazuhiko Tsutsum, Pillar Structures with the Space of Sub-Mi crons Fabricated by the Macroporous Based Micromachining. The 11th international conference on solid-state sensors an d actuators, Munich, germany, June 10-14, 2001, Transducers' 01 EU ROSENSORS XV, pages 1132-1135	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	08.08.02	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区般が関二丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 黒田 浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3250



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 9-504362 A(ブリティッシュ・テクノロジー・グループ・ユー エスエイ・インコーポレーテッド) 1997. 04. 28 全文、全図 & WO 94/29707 A1 & CA 2164720 A & US 5427663 A1 & EP 711412 A & US 5837115 A1	1-12
A	US 6156273 A(Prude Research Corporation) 2000. 12. 05 全文、全図 & WO 98/54568 A1	1-12
A	JP 11-508042 A(ビジブル ジェネティックス インコーポレイ テッド) 1999. 07. 13 全文、全図 & AU 6271896 A & AU 6274696 A & WO 96/42012 A1 & WO 96/42013 A1 & CA 2222628 A & CA 2226405 A & EP 830594 A & EP 830595 A & US 6110339 A1 & US 6176990 B1 & US 6261430 B1	1-12

